

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Terezie Svobodová

Interakce polyomavirových struktur v endoplasmatickém retikulu a na cestě do jádra
Interactions of polyomavirus structures in the endoplasmic reticulum and on the path to the
nucleus

Diplomová práce

Školitel: Sandra Huerfano-Meneses, M.Sc., Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30.04.2017

Podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Sandře Huerfano, Phd. za vedení práce, rady, připomínky a obrovskou trpělivost. Za pomoc a obětavost při konzultaci této práce děkuji doc. RNDr. Jitce Forstové.

Ráda bych také vyjádřila díky všem členům naší laboratoře, kteří mi vždy byli ochotni poradit zejména pak RNDr. Lence Horníkové, která vždy ochotně odpovídala na mé všetečné otázky a Mgr. Borisovi Ryabchenko za pomoc s metodou PLA a za rady s konfokální mikroskopií.

Mé díky rovněž patří naším laborantkám Vlastě Sakařové a Ivaně Polívkové.

Za psychickou podporu při studiu děkuji své rodině, studijní skupině Virologie a Alexejovi Prilepski, který pro mě byl obrovskou oporou po celou dobu studia.

Abstrakt

Myší polyomavirus (MPyV) je modelový virus čeledi *Polyomaviridae*. Aby mohlo dojít k infekci buňky a replikaci viru, musí být virový genom transportován do buněčného jádra. Řada studií nasvědčuje tomu, že viriony jsou transportovány do endoplasmatického retikula, odkud jsou za účasti hostitelských proteinů přeneseny do cytosolu. Mezi takové proteiny patří chaperon BiP (protein vázající imunoglobulin) a kochaperon DNAJ B14. Polyomaviry do jádra pravděpodobně vstupují jaderným pórem za účasti importinů.

Tyto procesy byly zatím studovány hlavně při infekci polyomavirem SV40. V této práci ukazujeme, že infekce MPyV vede ke změně lokalizace proteinu DNAJ B14, který se shlukuje do „foci“ ve kterých kolokalizuje s virovým kapsidovým proteinem VP1. Výskyt „foci“ se během infekce mění. Metodou „proximity ligation assay“ jsme ukázali, že DNAJ B14 a BiP se během časně infekce dostávají do bezprostřední blízkosti VP1. Bylo postulováno, že pro cílení virionů k proteinům asociovaným s ERAD a s translokací jsou důležité záporně nabitě aminokyseliny na N-konci minoritního virového proteinu VP2. Vytvořili jsme mutanty MPyV mutované v těchto aminokyselinách. Záporně nabitá aminokyselina v pozici 17 není nezbytná pro úspěšnou infektivitu MPyV. Roli kyselých aminokyselin v pozici 10 a 13 bude nutné dále ověřit. Kromě toho jsme vytvořili mutantu v jaderném lokalizačním signálu kapsidových proteinů, která dále posloužila jako nástroj pro studium transportu MPyV do jádra.

Klíčová slova: myší polyomavirus, časná fáze infekce, minoritní kapsidový protein VP2, NLS, endoplasmatické retikulum, DNAJ B14, BiP

Abstract

Mouse polyomavirus is a member and model virus of *Polyomaviridae* family. In order to infect cells and produce viral progeny, the viral chromosome must be transported to the nucleus. Several studies suggest that virions are transported to the endoplasmic reticulum, from which they are transferred to the cytosol with assistance of host proteins. Two of these proteins are the chaperon, BiP (binding immunoglobulin protein) and the cochaperone, DNAJ B14. Polyomaviruses probably enter the nucleus through nuclear pores with the assistance of importins.

These processes were mainly studied with SV40. In this work, we show that MPyV infection induces a change in distribution of the DNAJ B14 protein, which became clustered into foci, where it co-localizes with the viral capsid protein, VP1. The occurrence of foci varies during infection. With use of proximity ligation assay, we have shown that during an early phase of MPyV infection, DNAJ B14 and BiP get in the close proximity with VP1. It is suggested that negatively charged amino acids at the N-terminus of the minor capsid protein, VP2, are required for targeting virions to translocon and proteins associated with ERAD. We created MPyV with VP2 mutated in these amino acids. The negatively charged amino acid at position 17 is not necessary for successful infection of MPyV. The role of negatively charged amino acids in positions 10 and 13 needs to be further verified. In addition, we created MPyV virus mutated in the nuclear localization signals of its capsid proteins. The mutated virus further served as a tool for studying transport of MPyV into the nucleus.

Key words: mouse polyomavirus, early phase of infection, minor capsid protein VP2, NLS, endoplasmic reticulum, DNAJ B14, BiP

Obsah

1	Seznam zkratk	11
2	Úvod.....	13
3	Přehled literatury.....	15
3.1	Polyomaviridae.....	16
3.2	Myší Polyomavirus.....	18
3.2.1	Minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3.....	21
3.3	Doprava genomu polyomavirů do buněčného jádra.....	26
3.3.1	Vstup do buňky a doprava virionu do endoplasmatického retikula.....	26
3.3.2	Průchod polyomavirů endoplasmatickým retikulem	29
3.3.2.1	Strukturní změny virionů v endoplasmatickém retikulu	29
3.3.2.2	Funkce minoritních proteinů polyomavirů při průchodu endoplasmatickým retikulem 30	
3.3.2.3	Role hostitelských proteinů při průchodu polyomavirů endoplasmatickým retikulem 31	
3.3.3	Vstup polyomaviru do cytosolu.....	34
3.3.4	Vstup do jádra.....	37
3.3.5	Alternativní doprava genomu do jádra.....	38
4	Cíle práce.....	40
5	Materiál a Metody	42
5.1	Materiály.....	43
5.1.1	Chemikálie	43
5.1.2	Antibiotika.....	43
5.1.3	Kultivační média.....	44
5.1.3.1	Bakteriální média.....	44
5.1.3.2	Média pro tkáňové kultury	44
5.1.4	Protilátky	45
5.1.4.1	Primární protilátky	45
5.1.4.2	Sekundární protilátky (fluorescenčně značené / s konjugovanou peroxidázou)	45
5.1.5	Enzymy a inhibitory.....	46
5.1.6	Markery molekulových hmotností.....	46
5.1.7	Plasmidy.....	47
5.1.8	Primery/oligonukleotidy	47
5.1.9	Buněčné linie, bakteriální kmeny a viry.....	48

5.1.10	Komerční soupravy	48
5.1.11	Komerční roztoky	48
5.2	Metody	49
5.2.1	Práce s tkáňovými kulturami	49
5.2.1.1	Pasážování	49
5.2.1.2	Počítání buněk v Bürkerově komůrce	49
5.2.2	Práce s bakteriálními kmeny	50
5.2.2.1	Kultivace bakterií	50
5.2.2.2	Uchovávání bakteriálních kultur	50
5.2.3	Tvorba mutant a práce s DNA a s plasmidy	50
5.2.3.1	Cílená mutageneze	50
5.2.3.2	Transformace E.Coli pomocí elektroporace	51
5.2.3.3	Izolace plasmidů pomocí komerčních souprav	51
5.2.3.3.1	Minipreparace	51
5.2.3.3.2	Maxipreparace plasmidu a odstranění endotoxinů	51
5.2.3.4	Měření koncentrace DNA	51
5.2.3.5	Štěpení restrikčními endonukleázami	51
5.2.3.6	Ligace	52
5.2.3.7	Agarózová DNA elektroforéza	53
5.2.3.8	Izolace DNA z gelu	53
5.2.3.9	Precipitace DNA etanolem	53
5.2.3.10	Sekvenace	54
5.2.4	Příprava, izolace a práce viry	54
5.2.4.1	Transfekce myších fibroblastů 3T6	54
5.2.4.2	Infekce fibroblastů 3T6 myším polyomavirem	55
5.2.4.3	Reinfekce virovým inokulem	55
5.2.4.4	Izolace virionů	55
5.2.4.5	Centrifugace přes sacharózový polštář	56
5.2.4.6	Izopyktnická centrifugace v CsCl gradientu	56
5.2.4.7	Měření refraktometrického indexu	57
5.2.4.8	Dialýza	57
5.2.4.9	Dot blot	57
5.2.5	Testování virových izolátů	58
5.2.5.1	Určení hemaglutinačního titru	58
5.2.5.2	Určení imunofluorescenčního titru	58

5.2.5.3	Negativní barvení a elektronová mikroskopie	59
5.2.5.4	Příprava buněčného lyzátu	59
5.2.5.5	Určení koncentrace proteinů ve vzorku metodou Bradfordové	60
5.2.5.6	Určení koncentrace proteinů ve vzorku pomocí přístroje Qubit	60
5.2.5.7	Proteinová elektroforéza SDS – PAGE.....	60
5.2.5.8	Proteinová elektroforéza s použitím gradientového gelu	61
5.2.5.9	Fixace a barvení gelu po SDS -PAGE.....	61
5.2.5.10	Western blot.....	62
5.2.5.11	Detekce proteinů imobilizovaných na membráně	62
5.2.5.12	Izolace genomové DNA z virionů.....	63
5.2.5.13	Určení genomových ekvivalentů pomocí metody real time PCR	63
5.2.6	Další metody.....	64
5.2.6.1	Fixace buněk a nepřímá imunofluorescence.....	64
5.2.6.2	Konfokální mikroskopie a zpracování obrazu pomocí ImageJ.....	65
5.2.6.3	Proximity ligation assay	66
6	Výsledky.....	67
6.1	Myší polyomavirus a jeho interakce s vybranými proteiny endoplasmatického retikula během časně fáze infekce	68
6.1.1	Produkce a izolace myšího polyomaviru.....	68
6.1.2	Změna lokalizace DNAJ B14 a kolokalizace s VP1 v časně fázi infekce myším polyomavirem	70
6.1.3	Výskyt shluků DNAJ B14 a VP1 během časně fáze infekce	75
6.1.4	Testování vzdálenosti DNAJ B14 a VP1 v buňce metodou „proximity ligation assay“.....	78
6.1.5	Studium výskytu VP1 s BIP v časně fázi infekce.....	79
6.2	Mutageneze kapsidového proteinu VP2	81
6.3	Produkce a charakterizace mutovaného myšího polyomaviru	89
6.3.1	Viriony MPyV D10A mají snížený obsah mutovaného minoritního proteinu VP2.	95
6.3.2	MPyV D10A má sníženou produkci VP2	97
6.4	Vliv provedených mutací VP2 na infektivitu viru.....	98
6.5	Produkce myšího polyomaviru s mutovaným jaderným lokalizačním signálem.	103
6.5.1	Mutageneze jaderného lokalizačního signálu strukturních proteinů.....	103
6.5.2	Charakterizace virionů mutovaných v jaderném lokalizačním signálu	106
7	Diskuze.....	110
7.1	Sledování lokalizace DNAJ B14 a VP1 v buňce během infekce myším polyomavirem.....	111

7.2	Produkce a charakterizace virionů MPyV mutovaných v záporně nabitých aminokyselinách D10 a E17 na N konci VP2.	115
7.3	Změna infekitivity mutant D10A a E17A.....	117
7.4	Příprava mutovaného MPyV v NLS strukturních proteinů.....	119
8	Shrnutí	120
9	Seznam použité literatury	122

1 Seznam zkratek

A	ala, alanin
ADP	adenosindifosfát
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
AMP	ampicilin
AK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát
BAP29, 31	s receptorem B buněk asociovaný protein 29, 31
BiP	protein vázající imunoglobulin
BKV	BK virus
D	Asp, aspartát, kyselina asparagová
derlin	protein degradace v endoplasmatickém retikulu (der1 like)
DJANGOS	globulární jaderná struktura asociovaná s DNAJ
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNAJ	chaperony DnaJ (J-doména), rodina Hsp40 (heat shock protein 40 kD)
E	Glu, glutamát, kyselina glutamová
E2F	E2 transkripční faktor (rodina)
EMC	membránový proteinový komplex endoplasmatického retikula
ER	endoplasmatické retikulum
ERAD	s ER asociovaná degradace
ERdj	homolog DnaJ lokalizovaný v endoplasmatickém retikulu
Erp	protein endoplasmatického retikula
E.Coli	Escherichia coli
F1, F2, F3	frakce 1, 2, 3
GD1, GD1b	disialogangliosid 1, 1b
GM1	monosialogangliosid 1
Grp170	glukózou regulovaný protein 170
GT1b	trisialogangliosid 1b
H1	histon 1
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
hpi	(počet) hodin po infekci
Hsp, Hsc	rodina chaperonů - proteiny teplotního šoku
ICTV	mezinárodní komise pro taxonomii virů
JCV	JC virus
K	lys, lysin
kDa	kilodaltony
LB	Luria – Bertani médium
LIPyV	Lyon IARC polyomavirus
LT	velký T antigen
miRNA	micro ribonukleová kyselina
MPyV	myší polyomavirus
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MT	střední T antigen
NEF	výměnný faktor nukleotidů

NK	negativní kontrola
NLS	jaderný lokalizační signál
nm	nanometr
p53	protein 53
PDI	protein disulfid izomeráza
PLA	proximity ligation assay
PTA	fosfowolframová kyselina
PP2A	protein fosfatáza 2A
Rb	retinoblastomový protein
RMA1	RING protein s membránovou kotvou1
RT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězcová reakce
Sel1L	(protein) podobný supresoru proteinu Lin12 malý na glutamin bohatý protein obsahující tetratrikopeptidické opakování
SGTA	alpha
siRNA	malá interferující ribonukleová kyselina
ST	malý T antigen
SV40	opičí (simian) vakuolární virus 40
TSPyV	trichodysplasia spinulosa polyomavirus
VLP	virům podobné částice
VP1	virový protein 1
VP2	virový protein 2
VP3	virový protein 3
WT	divoký kmen

2 Úvod

Viry stále rostoucí čeledi *Polyomaviridae* mají široké hostitelské spektrum v živočišné říši. K již dříve známým dvěma lidským polyomavirům přibyla v posledních letech řada dalších. Pokud polyomaviry infikují zdravého jedince, nepůsobí mu většinou významné klinické projevy. To jsou důvody, proč jsou velmi rozšířeny v lidské populaci. Přesto jsou některé lidské polyomaviry z medicínského hlediska závažné. Mohou působit velké až fatální zdravotní komplikace u osob se sníženou imunitou. Kromě toho mají tyto viry tumorogenní potenciál.

Polyomaviry jsou malé viry, které jsou evolučně přizpůsobeny svému hostiteli. Čím menší viry, tím více bývají závislé na funkcích hostitelské buňky. Na druhé straně, genové produkty virů s omezenou kódující kapacitou jejich malých genomů bývají často pozoruhodně multifunkční. Dokážou efektivně manipulovat hostitelským buněčným aparátem a buněčným cyklem.

Studium modelových polyomavirů v minulosti přispělo k pochopení mechanismů fungování buněčného aparátu a funkce některých faktorů důležitých v regulaci buněčného cyklu i k poznání procesů tumorigenese. I dnes výzkumy polyomavirů přinášejí poznatky obecného významu. Protože se polyomaviry replikují v buněčném jádře, musely si osvojit trik, jak se od buněčné membrány dostat spletítymi strukturami cytoplazmy do jádra. Protože viry nemají vlastní pohybový aparát zneužívají pro tuto cestu buněčné transportní systémy. V současné době probíhají výzkumy, které se snaží mechanismy jejich transportu odhalit a zároveň získané poznatky využít v biomedicině při dopravě a cílení látek do buněk.

Studium transportu polyomavirů buňkou je tedy podstatné hned z několika důvodů. Pomáhá pochopení infekčního cyklu viru, rozšiřuje znalosti o buněčných systémech a poznatky z těchto studií mohou mít význam pro biotechnologie a medicínu.

V této diplomové práci se zaměříme na modelový myší polyomavirus a na některé aspekty jeho transportu z endoplasmatického retikula do jádra.

3 Přehled literatury

3.1 *Polyomaviridae*

Myší polyomavirus (MPyV) se řadí do čeledi *Polyomaviridae*. Viry náležící do této skupiny jsou neobalené viry s ikosahedrální symetrií, jejichž genom je tvořen kruhovou dvouřetězcovou DNA (skupina I Baltimorovy klasifikace). Jedná se o viry s tumorogenním potenciálem.

Ačkoli byl první polyomavirus objeven v pľlce minulého století (Gross, 1953), v posledních deseti letech přibýlo mnoho nově objevených polyomavirů a dnes se do této čeledi podle mezinárodní komise pro taxonomii virů (ICTV) řadí již 80 druhů (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Ty jsou taxonomicky rozdělené do čtyř rodů, jmenovitě *Alphapolyomavirus*, *Bethapolyomavirus*, *Delthapolyomavirus* a *Gammapolyomavirus* (Obrázek 1, Calvignac-Spencer et al., 2016). Někteří zástupci zůstávají nezařazení a je pravděpodobné, že se tento taxon bude v budoucnosti dále rozšiřovat.

Hostitelské spektrum polyomavirů je velmi široké, mezi hostiteli těchto virů najdeme zástupce plazů, ryb, ptáků a savců. Namátkou můžeme jmenovat hýla obecného, delfína obecného, chřestýše černoocasého nebo třeba tučňáka kroužkového. Známé je několik hlodavčích a mnoho opičích polyomavirů. Ani lidé jako hostitelé polyomavirů nejsou výjimkou. V tomto roce (duben 2017) byl zveřejněn objev již čtrnáctého lidského polyomaviru, kterým je Lyon IARC PyV (LIPyV) (Gheit et al., 2017).

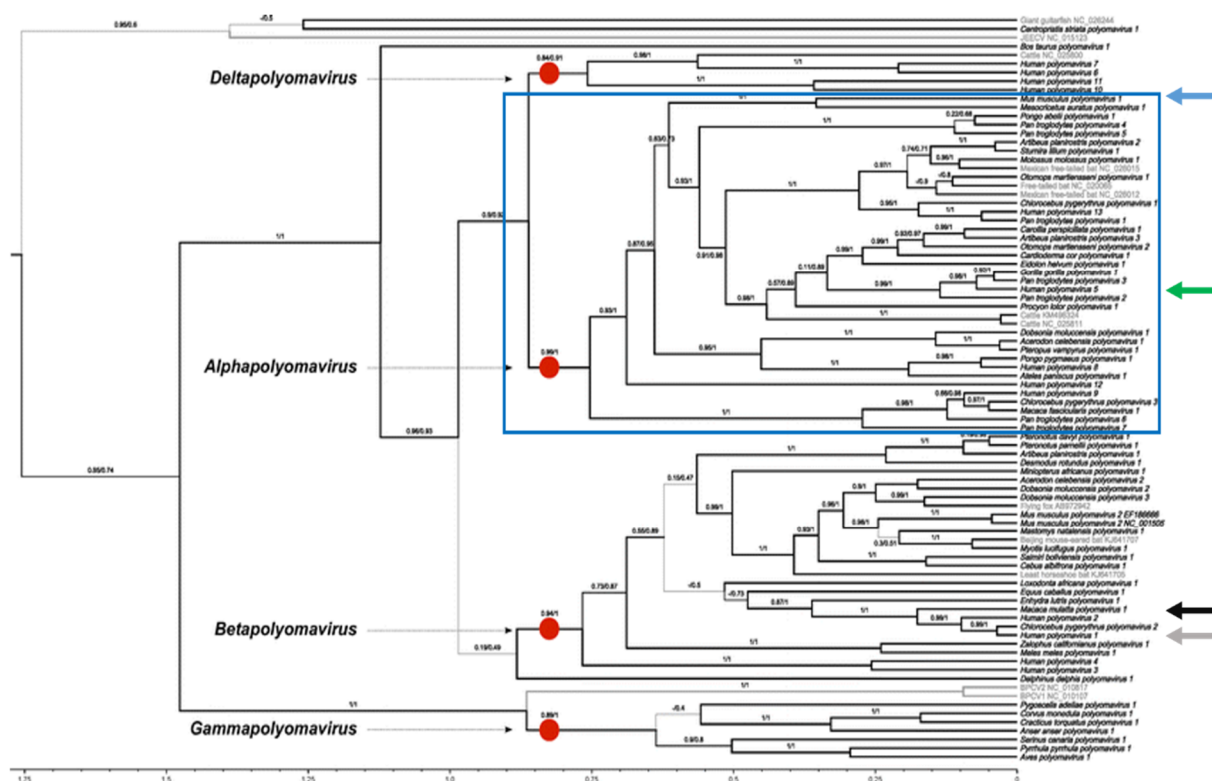
Polyomaviry jsou v lidské populaci velmi rozšířené. Séroprevalence lidského polyomaviru 1 (BK virus) dosahuje v české republice téměř 70 % a ve Švýcarsku 80 %. Séroprevalence lidského polyomaviru 2 (JC virus) se v obou zemích pohybuje okolo 60 % (Šroller et al., 2014 a Egli et al., 2009). Většina infekcí lidskými polyomaviry probíhá pravděpodobně bezpříznakově, za některých podmínek ale mohou lidské polyomaviry způsobit vážné zdravotní komplikace. JC polyomavirus může u pacientů s AIDS, nebo u pacientů léčených imunosupresivními léčivými jako je Natalizumab, způsobovat progresivní multifokální leukoencefalopatii. Jedná se o onemocnění s vysokou mortalitou, při kterém dochází k demyelizaci axonů. JCV může rovněž způsobovat encefalopatii či meningitidu (Adang a Berger, 2015). BK polyomavirus způsobuje komplikace při transplantacích, zejména nefropatii ledvin (Jamboti, 2016). Polyomavirus Trichodysplasia spinulosa (TSPyV, lidský polyomavirus 8) je původcem stejnojmenného kožního proliferativního onemocnění, které se vyskytuje u jedinců se silně oslabeným imunitním systémem (van der Meijden et al., 2010). Polyomavirus Merkelových buněk (MCPyV, lidský polyomavirus 5) je spojován s kožními nádory (Feng et

al., 2008 a Rodig et al., 2012). Riziko vzniku těchto nádorů, které se nazývají karcinomy Merkelových buněk, je zvýšené u osob se sníženou imunitou jako jsou pacienti infikovaní virem HIV (Engels et al., 2002). Je zřejmé, že nejvíce jsou polyomaviry ohroženi jedinci s imunodeficiencí, a to jak vrozenou, tak navozenou farmaceutiky, jako je tomu u pacientů po transplantaci orgánů, nebo pacientů léčených chemoterapií. Ohroženi jsou rovněž pacienti trpící AIDS nebo autoimunitním onemocněním.

V minulosti byly polyomaviry intenzivně studovány. Tyto výzkumy nám přinesly cenné poznatky nejen v oblasti virologie, ale rovněž i v oblasti buněčné a molekulární biologie. Jako modelové organismy byly studovány zejména lidský BK polyomavirus (*Bethapolyomavirus*), opičí polyomavirus SV40 (Simian vacuolating virus 40, *Bethapolyomavirus*) a myší polyomavirus MPyV (*Alphapolyomavirus*).

Opičí polyomavirus SV40 byl objeven za poměrně dramatických okolností. Byl identifikován jako kontaminace Sabinových vakcín proti obrně a jako kontaminace buněčné linie, používané pro přípravu těchto vakcín (Sweet a Hilleman, 1960). Brzy po tomto odhalení bylo zjištěno, že SV40 má tumorogenní potenciál a indukuje vznik nádorů u křečků (Eddy et al., 1962).

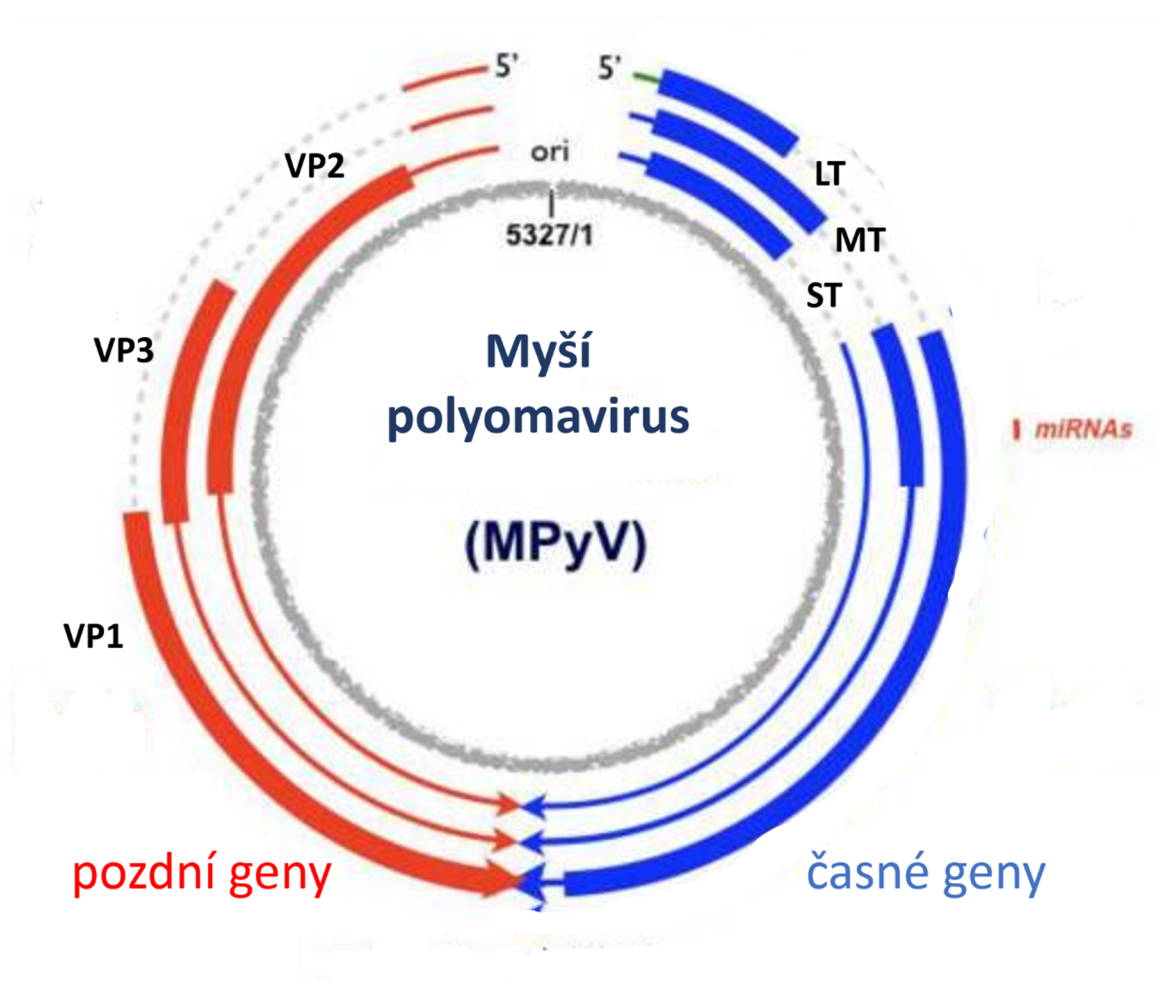
MPyV byl prvním objeveným polyomavirem (1953). Byl objeven jako neznámý agens způsobující periferní nádory krku u myší (Gross, 1953). Tento virus, jakožto modelový organismus, je významný také z toho důvodu, že je fylogeneticky příbuznější epidemiologicky důležitým virům MCPyV a TSPyV než SV40 (Obrázek 2) (Calvignac-Spencer et al., 2016, van der Meijden et al., 2010 a Feng et al., 2008). Biologii tohoto viru se blíže věnuji v následujících kapitolách.



Obrázek 1: **Fylogenetický strom čeledi *Polyomaviridae*.** Zobrazen je Bayesiánský chronogram sestavený podle sekvencí velkého T antigenu. Větve jednotlivých rodů jsou označeny červeným kolečkem, modrý čtverec vyznačuje rod *Alphapolyomavirů* do kterého náleží MPyV. Šipky označují pozici vybraných zástupců, modrá-MPyV, zelená-MCPyV, černá-SV40, šedá-BKV. Převzato a upraveno z (Calvignac-Spencer et al., 2016).

3.2 Myší Polyomavirus

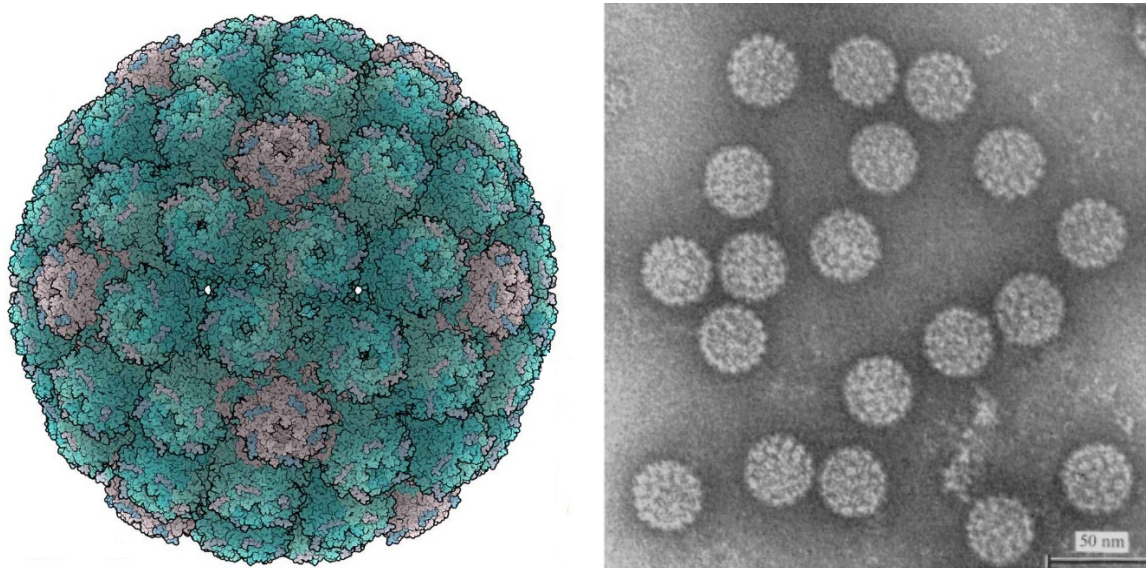
Genom myšího polyomaviru tvoří kruhová dvouřetězcová DNA o velikosti přibližně 5,3 kbp. Tato DNA kóduje celkem šest proteinů, tři strukturní a tři nestrukturní. Mezi strukturní proteiny patří hlavní kapsidový virový protein 1 (VP1) a dva minoritní kapsidové virové proteiny 2 a 3 (VP2 a VP3). Geny pro tyto proteiny jsou transkribovány ze stejného vlákna (Deininger et al., 1979), z opačného vlákna probíhá transkripce genů pro velký, střední a malý tumorogenní antigen (LT, MT a ST, Friedmann et al., 1979, Soeda et al., 1979). Alternativním sestřihem vznikají tři mRNA pro jednotlivé kapsidové proteiny a tři mRNA pro nestrukturní proteiny. Oblast kódující nestrukturní proteiny se označuje jako časná a oblast kódující strukturní proteiny jako pozdní. Tyto názvy souvisí s načasováním transkripce během infekce. Mezi časnou a pozdní oblastí se nachází nekódující oblast, ve které se nachází sekvenční počátek replikace (*ori*) a regulační oblasti (Soeda et al., 1979, Tyndall et al., 1981). Myší polyomavirus kóduje kromě proteinů i miRNA (Sullivan et al., 2009). Mapa genomu je uvedena na Obrázek 2. Přehledně shrnuto v (Carmichael, 2016, review).



Obrázek 2: **Organizace genomu myšího polyomaviru.** Mapa genomu byla vytvořena pro MPyV, kmen NG59RA. Modře jsou vyznačeny časně geny, červeně je označena pozdní oblast. Tlusté čáry vyznačují oblasti otevřených čtecích rámců, tenké jsou vyznačeny transkripty, přerušovaná čára odpovídá intronům. Šipky označují směr transkripce. Počátek replikace je označen jako „ori“. Na obrázku je červeně rovněž vyznačena oblast, která kóduje miRNA. Převzato a upraveno podle (Carmichael, 2016).

Nestrukturní proteiny zajišťují replikaci genomu, regulaci buněčného cyklu hostitele a jsou rovněž zodpovědné za imortalizaci a tumorogenezi infikovaných buněk. Velký T antigen (LT) slouží jako helikáza při replikaci virového genomu. Oligomerizuje a nasedá do replikačního počátku a pomáhá rozšiřovat replikační vidličku. LT vyvazuje hostitelské proteiny rodiny Rb z transkripčního faktoru E2F, čímž indukuje vstup buňky do S fáze. Střední a malý T antigen (MT a ST) se zapojují do některých buněčných signalizačních drah, které vedou k inaktivaci p53 a stimulaci progresu buněčného cyklu. MT antigen je membránový protein, který aktivuje dráhu signální transdukce interakcí s regulační podjednotkou PP2A fosfatázy, s protein kinázou Src. Je hlavním virovým onkogenem. V lytickém cyklu reguluje virovou replikaci a transkripci (Brodsky and Pipas, 1998, review, Nemethova et al., 2004, Fluck and Schaffhausen, 2009, review).

Strukturní proteiny tvoří virovou kapsidu. Kapsida má průměr přibližně 45 nm. Struktura kapsidy má ikosahedrální symetrii s triangulačním číslem 7 (Finch, 1974). Je složena ze 72 kapsomer - pentamerů proteinu VP1 z nichž 60 je hexavalentních a 12 pentavalentních (sousedí s šesti nebo pěti dalšími pentamery (Rayment et al., 1982)). Struktura je uvedena na Obrázek 3. Monomery VP1 mezi sebou interagují disulfidickými můstky, tvoří tímto způsobem pentamery, které mají mírně kónický tvar s prohlubní z vnitřní strany kapsidy. Do této prohlubně se vážou minoritní proteiny (Griffith et al., 1992, Chen et al., 1998 a Stehle and Harrison, 1996). Uvnitř virionu se nachází virový minichromozom tvořený virovým genomem a čtyřmi buněčnými histony. Histon H1 se ve virionu nenachází (Fey a Hirt, 1974). Při infekci vznikají rovněž různé tubulární útvary a prázdné virové částice, které virovou DNA neobsahují.



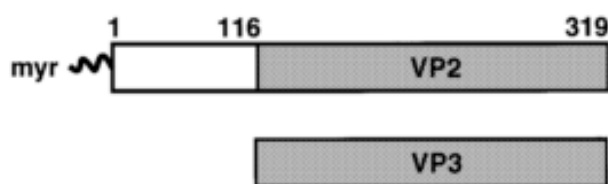
Obrázek 3: **Struktura myšího polyomaviru:** Struktura myšího polyomaviru (vlevo), vytvořená z dat PDB: 1sid (Stehle a Harrison, 1996) , autor: Jean Yves Sgro, dostupné z (<http://www.virology.wisc.edu/virusworld/viruslist.php?virus=pol>), pentavalentní kapsomery jsou růžové, hexavalentní kapsomery jsou tyrkisové. Snímek virionů MPyV z elektronového mikroskopu, převzato a upraveno (Finch, 1974), vpravo.

Myší polyomavirus se na cytoplasmatické membráně váže na receptor a následně je endocytován. Váčkovým transportem se dostává až do endoplasmatického retikula. V endoplasmatickém retikulu dochází ke strukturním změnám kapsidy a k částečnému rozvolnění virionu. Virion opouští endoplasmatické retikulum a virový genom se dostává do jádra (kapitola 3.3). Zde dochází k transkripci časných genů. Z virových mRNA vznikají v cytoplasmě proteiny, včetně LT antigenu, které se vrací do jádra. LT antigen zahajuje replikaci virového genomu. S replikací je spojený takzvaný „early – late switch“ po kterém se výrazně zvyšuje transkripce pozdních genů a produkce strukturních proteinů. Vznik pozdních virových transkriptů je poměrně složitý a dochází při tom k tvorbě velkého množství

intemediátů. Nejprve vznikají dlouhé úseky RNA, které obsahují několikrát přepsaný celý virový genom. Z těchto obrovských molekul se postupně vystřihávají celé úseky a vzniká mRNA pro daný protein obsahující kodující sekvenci a různý počet „leader“ sekvencí (Carmichael, 2016, review). Strukturní proteiny tvoří hned po syntéze v cytoplasmě komplexy (pentamery VP1 s navázaným jedním nebo druhým minoritním, kapsidovým proteinem) a společně se přesouvají do jádra. V jádře se ze strukturních proteinů a virového minichromosomu sestavují viriony. Následně dochází k lýzi buňky a uvolnění virového potomstva do okolí.

3.2.1 Minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3

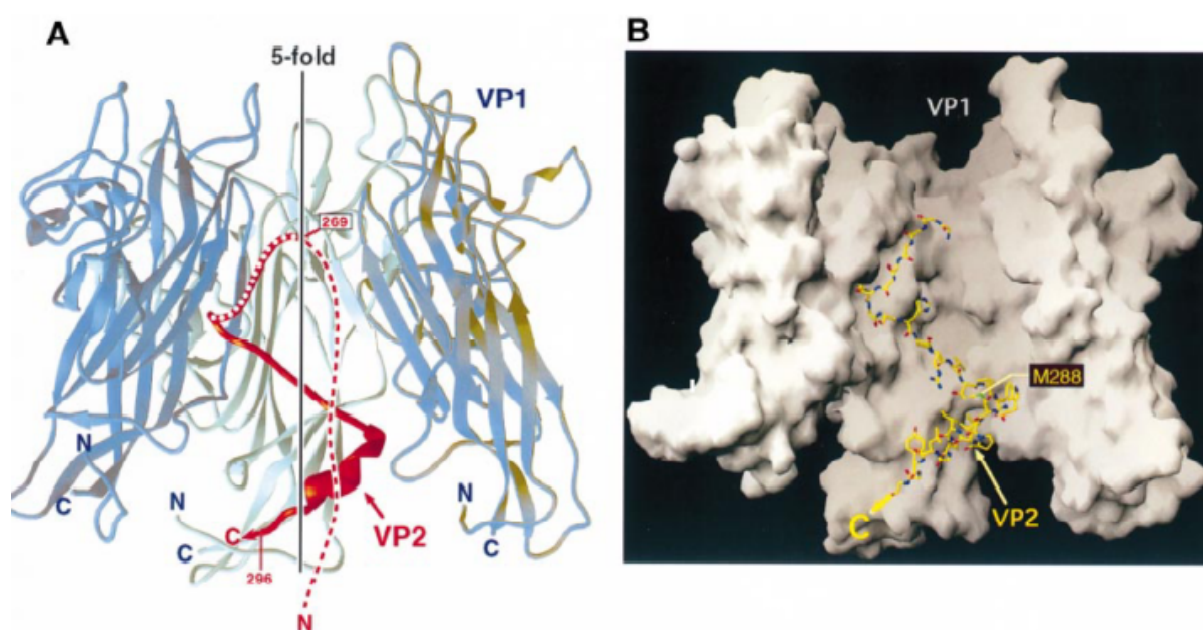
Minoritní proteiny VP2 a VP3 jsou transkribovány ze stejného čtecího rámce. Protein VP3 je zkrácenou verzí proteinu VP2, koresponduje s přibližně dvěma třetinami délky C-koncové sekvence VP2 (Obrázek 4). Sekvence kódující jejich společný C-konec se z části překrývá se začátkem kódující sekvence pro VP1 (Deininger et al., 1979). VP2 má velikost 32,9 kDa a VP3 23 kDa (McMillen and Consigli, 1974 Burkert et al., 2014)



Obrázek 4: **Schéma minoritních proteinů VP2 a VP3 myšího polyomaviru.** Protein VP3 má stejnou sekvenci jako C-koncová část VP2. Protein VP2 má navíc N-koncovou unikátní část. VP2 je na N-konci myristylován. Oba proteiny mohou nést další postranlační modifikace, které nejsou na obrázku vyznačeny. Převzato a upraveno z (Chen et al., 1998)

Minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3 se nacházejí uvnitř virionu pod povrchem tvořeným hlavním kapsidovým proteinem VP1. Stechiometrický poměr kapsidových proteinů je jeden minoritní protein na jeden pentamer VP1. Minoritní protein se váže prostřednictvím hydrofobních interakcí doprohlubně pentameru VP1 svým C koncem. Interaguje se třemi monomery VP1 zároveň. V kapsidě je C konec minoritních proteinů strukturně uspořádán do dvou alfa helikálních smyček, ty jsou následovány prudkým 90° ohybem. Protein dále pokračuje do vrcholu prohlubně, kde tvoří smyčku a vrací se směrem do středu kapsidy (Obrázek 5). Zbylá část proteinu je pravděpodobně velmi flexibilní a nestrukturovaná. V krystalografické studii, díky které máme tyto informace o struktuře, byl použit zkrácený protein VP2, je tedy možné že při plné délce se tvoří další vyšší struktury (Chen et al., 1998 a Barouch

and Harrison, 1994). Disociační konstanta mezi *in vitro* vytvořenými komplexy VP1/VP2 a VP1/VP3 se téměř neliší a síla vazby VP2 a VP3 s hlavním kapsidovým proteinem je tedy podobná (Delos et al., 1995, Burkert et al., 2014). Zajímavé je, že minoritní proteiny nejsou nezbytné pro sestavení kapsidy. Protein VP1 je schopen se za určitých podmínek *in vitro* samouspořádat do útvarů virům podobných částic (VLP) i bez přítomnosti minoritních proteinů či jiných virových složek (Salunke et al., 1986). Tomu odpovídá i fakt, že konformace kapsomeru VP1 se výrazně neliší od konformace kapsomeru VP1 s navázaným C koncovým peptidem minoritního proteinu. V pentameru s navázaným minoritním proteinem pouze dojde k mírnému rozšíření o 2-3 Å báze tohoto útvaru (Chen et al., 1998).



Obrázek 5: **Struktura komplexu VP2 a VP1.** A: Stuhový model průřezu kapsomerou. Červeně je značen protein VP2. Přerušovaná čára značí oblast, ve které nebylo možné odečíst strukturu kvůli nízké elektronové denzitě. V modré barvě jsou prezentovány tři pentamery VP1, které jsou v kontaktu s VP2. Zbylé dva monomery VP1 nejsou na modelu zobrazeny. B: Vizualizace povrchu stejného komplexu jako je na obrázku A. Bíle je vykreslena prostorová struktura VP1, žlutě je vykreslena poloha VP2. Převzato z (Chen et al., 1998)

VP1, kromě toho že je schopen vytvořit strukturu kapsidy, má také schopnost vázat nespecificky DNA a je rovněž zodpovědný za vazbu virionu k buněčným receptorům (Chang et al., 1993, Caruso et al., 2003b). Pro VP2 a VP3 dlouho nebyla nalezena žádná funkce. Pro organizaci genomu malých virů je typický prostorový minimalismus. Virové genomy s omezenou velikostí kódují veškeré funkce potřebné pro replikační cyklus. Bylo by poměrně zvláštní, kdyby MPyV kódoval dva proteiny, které by neměly žádnou funkci. V čem tedy spočívá role VP2 a VP3 v infekčním cyklu a jaké mají tyto proteiny vlastnosti?

Ukazuje se, že minoritní proteiny MPyV jsou nezbytné pro úspěšnou infekci. Mutované MPyV, které neprodukují některý z minoritních proteinů mají výrazně sníženou infektivitu (Mannová et al., 2002). Zároveň u nich byly pozorovány časté reverzní mutace. Mutant, který neprodukuje ani jeden z minoritních proteinů naprosto ztrácí schopnost tvořit plaky v buněčné kultuře (Sahli et al., 1993). Bylo zjištěno, že minoritní proteiny jsou vyžadovány v časně fázi infekce, tedy při vstupu do buňky a dopravení genomu do jádra (Mannová et al., 2002).

Protein VP2 je na svém N-konci postranslačně modifikován. Jedná se o myristylaci na glycinu, který je druhou aminokyselinou VP2 (Obrázek 4, Streuli and Griffin, 1987). Obecně může myristylace proteinu sloužit jako kotva, která zajišťuje interakci proteinu s membránou. Role této modifikace VP2 v infekční cyklu MPyV byla studována na sérii mutant, které měly substitovaný myristylovaný glycin jinou aminokyselinou. Ve všech případech se ukázalo, že myristylovaný glycin je nutný pro normální průběh infekce. Zůstává nicméně nejasné, v jaké fázi infekce se myristylovaný VP2 uplatňuje a jaká je funkce této modifikace. Pokud byl glycin zaměněn za malý alanin, došlo ke zpoždění průběhu infekce. Replikace a produkce strukturního proteinu VP1 byla opožděna o několik hodin, specifická infektivita byla výrazně snížena. Tyto výsledky naznačují, že myristylace sehrává nějakou roli při vstupu virionu do buňky a dopravení genomu do jádra (Sahli et al., 1993). Pokud byl ale glycin substituován za záporně nabitou kyselinu glutamovou nebo neutrální glutamin, zůstal průběh infekce ve srovnání s divokým kmenem nezměněn v prvním kole infekce. Výrazné snížení infekivity oproti nemutovanému MPyV bylo pozorováno až po reinfekcích (Mannová et al., 2002). Po transfekci vykazovala mutanta s kyselinou glutamovou sníženou produkci virového potomstva (Krauzewicz et al., 1990). Podle těchto výsledků sehrává myristylace VP2 důležitou roli v pozdní fázi infekce, při skládání virionu či uvolňování virového potomstva z infikované buňky a reinfekci. Je samozřejmě také možné, že samotná změna aminokyselinové sekvence proteinu VP2 může ovlivnit jeho funkci nezávisle na myristylaci. Myristylace na N-konci VP2 neovlivňuje biofyzikální charakteristiky tohoto proteinu (Burkert et al., 2014). Kromě myristylace nesou minoritní proteiny i další modifikace. VP3 je acetylován na N-koncovém alaninu (Vít, 2010 - diplomová práce). Oba minoritní proteiny mohou tvořit izoformu s deaminovaným asparaginem v pozici 253 VP2 (137 pro VP3). Substituční mutace tohoto asparaginu nevedla ke změně průběhu infekce v transfekovaných a reinfikovaných buňkách. Autorka práce se domnívá, že by deaminací asparaginu mohla vznikat stabilnější forma minoritního proteinu, ale tato hypotéza zatím nebyla testována (Bílková, 2014 - diplomová práce)

Na C konci, který je společný pro VP2 a VP3 se kromě oblasti zodpovědné za interakci s pentamerem VP1 (AK 269–296) nalézá i jaderný lokalizační signál (NLS) (Chen et al., 1998 a Chang et al., 1992). Ten je dostatečně silný na to, aby po fúzování s cytoplasmatickými proteiny, zajistil jejich přenos do jádra. Samostatně produkováný VP2 v savčích buňkách má díky této signální sekvenci jadernou lokalizaci (Chang et al., 1992). Pokud je VP2 produkováný v savčích buňkách společně se zkrácenou verzí VP1, které chybí její vlastní lokalizační signál, dokáže VP2 dopravit do jádra i tento zkrácený VP1 (Cai et al., 1994). Další studie ukázaly, že minoritní proteiny VP2 a VP3 mají rovněž afinitu k buněčným membránám, zejména k jaderné membráně a membráně endoplasmatického retikula a do jádra se dostávají, pokud jsou produkovány samostatně (bez VP1) jen z části (Huerfano et al., 2010). V hmyzích buňkách má samostatně produkováný VP3 difúzní cytoplasmatickou lokalizaci, VP2 se nachází na membránách v okolí jádra a k přesunu obou proteinů do jádra je vyžadována přítomnost VP1 (Forstova et al., 1993 a Delos et al., 1993). Tento rozdíl demonstruje odlišnosti hostitelského importního aparátu.

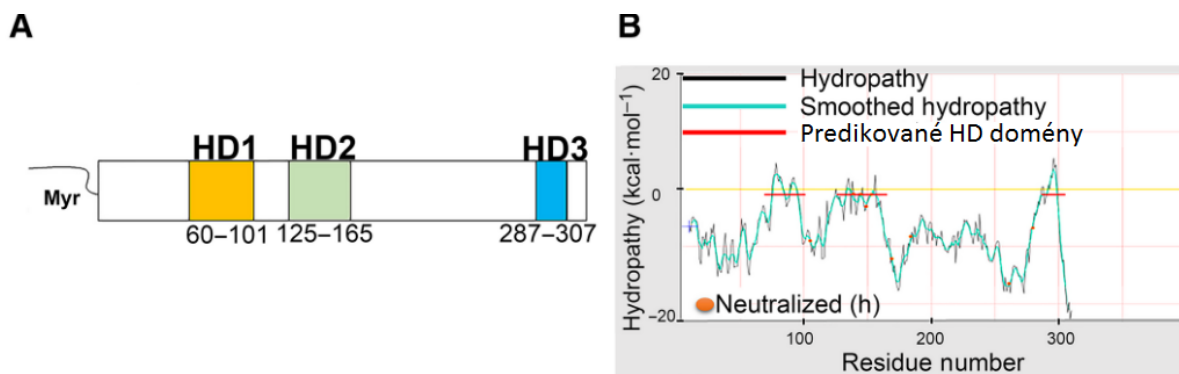
Je zřejmé, že jaderný lokalizační signál VP2 má důležitou úlohu v pozdní fázi infekce, kdy dochází k produkci a skládání virionů. Virové strukturní proteiny VP1 a VP2 nebo VP3 spolu interagují v cytoplasmě a společně se přesouvají do jádra, kde může následně dojít ke skládání virionů (Cai et al., 1994 a Barouch and Harrison, 1994). Zda jaderný lokalizační signál minoritních proteinů MPyV má nějakou roli v časně fázi infekce, například v dopravení genomu do jádra, není zatím jasné. Studie provedené s dalšími zástupci polyomavirů, například s lidským BKV ukazují, že tomu tak být může (Bennett et al., 2015). Více se této problematice věnuji v kapitole 3.3.4.

Jak bylo nastíněno výše, kapsomery VP1 po navázání C-koncového peptidu minoritních proteinů téměř nemění svojí strukturu (Chen et al., 1998). Po *in vitro* inkubaci VP1 s minoritními proteiny se nicméně mění přístupnost epitopu v povrchové BC smyčce VP1 pro protilátky (Delos et al., 1995). Tento fenomén, byl pozorován i při společné expresi strukturních proteinů v hmyzích buňkách (Li et al., 1995). Kromě toho, VP2 moduluje postranlační modifikace VP1 v hmyzích buňkách. VP1 produkováný v Sf9 má jiný fosforylační profil než při infekci v savčích buňkách. Pokud se ovšem produkuje společně s VP2, fosforylační profil VP1 se změní a je více podobný fosforylačnímu profilu VP1 při infekci. Dochází k nabohacení fosforylace threoninu (Forstova et al., 1993 a Li et al., 1995). Fosforylovaný threonin se nachází právě v oblasti BC smyčky (Li et al., 1995 a Li et al., 1995). Nejspíše dochází ke změně konformace při navázání VP2/VP3 na VP1, která umožňuje fosforylaci.

Dalším interakčním partnerem minoritních proteinů jsou histony. Buněčné histony jsou součástí MPyV minichromosomu (Fey and Hirt, 1974 a Frearson and Crawford, 1972). Protilátka proti minoritním proteinům koimunoprecipituje histony z lyzátu infikovaných buněk a rekombinantní VP2 *in vitro* interaguje s histony (Forstova et al., 1993 a Cai et al., 1994). Zajímavé je, že na rozdíl od polyomaviru SV40, minoritní proteiny MPyV nemají schopnost vázat DNA a to ani genomovou DNA myšího polyomaviru (Chang et al., 1993). Není jasné, zda a jakou mírou vazba histonů minoritními proteiny přispívá k enkapsidaci virového minichromosomu, nebo ke stabilitě struktury virionu. Jak bylo zmíněno, hlavní kapsidový protein VP1 interaguje s virovou či plasmidovou DNA (Chang et al., 1993). Mutantní MPyV, které neobsahují jeden z minoritních proteinů, enkapsidují virový genom (Mannová et al., 2002). VP1 produkovaný bakulovirovým systémem, je schopen balit do VLPs buněčnou DNA (Gillock et al., 1997). Podobně, *in vitro* samouspořádané pseudokapsidy tvořené pouze proteinem VP1, enkapsidují jakoukoliv DNA a dokáží ji doručit do savčích buněk (Forstova et al., 1995). Toto nicméně nemusí znamenat, že se proteiny VP2 a VP3 při infekci na morfogenezi virionu vůbec nepodílejí. Podle Griffitha a jeho kolegů může být role VP2 a VP3 při skládání virionů taková, že pomáhají při navádění kapsomer kolem nukleohistonového jádra a přispívají tak k tvorbě vysoce uspořádané kapsidy (Griffith et al., 1992).

Jak bylo zmíněno, minoritní kapsidové proteiny jsou uvnitř virionu pravděpodobně z velké části nestrukturované (Chen et al., 1998). Nicméně, tyto proteiny samostatně produkované a izolované z *E. Coli* obsahují velký podíl alfa helikálních struktur, přičemž helicity N-konce VP2 (1-114 AK) je vyšší než helicity C-konce (Burkert et al., 2014). VP2 obsahuje tři hydrofobní domény, dvě z nich jsou společné pro VP2 a VP3, jedna hydrofobní doména je unikátní pro VP2 (Obrázek 6, Huérfano et al., 2017). Díky hydrofobnímu charakteru mají VP2 a VP3 afinitu k membránám. Zanořují se do membrány a způsobují hemolýzu krevních buněk (Burkert et al., 2014). Bylo popsáno, že se oba minoritní proteiny zanořují do membrány liposomů a VP2 je navíc schopen membrány perforovat (Rainey-Barger et al., 2007). Huérfano a spol. zjistili, že oba samostatně produkované minoritní proteiny jsou v savčích buňkách cytotoxické. Vážou se do buněčných membrán, poškozují membrány mitochondrií a endoplasmatického retikula a indukují na kaspázách závislou apoptózu. Jejich destruktivní vliv je výrazně zmírněn, pokud jsou v komplexu s VP1. Nabízí se hypotéza, že se tyto proteiny uplatňují v destrukci buněk v pozdní fázi infekce. Nicméně k apoptóze buněk v pozdní fázi infekce dochází i u mutovaného MPyV, který má mutované ATG kodony pro syntézu proteinů VP2 a VP3. Akce minoritních proteinů tedy není nutná pro zajištění smrti infikované buňky a uvolnění nových virionů.

(Huerfano et al., 2010). Zde je zřejmý rozdíl ve funkci minoritních proteinů MPyV a viru SV40. Role minoritních proteinů SV40 v indukci nekrózy infikovaných buněk v pozdní fázi infekce byla popsána (Daniels et al., 2006b). Nedávná studie naopak ukázala, že hydrofobicita minoritních kapsidových proteinů MPyV a s tím spojená schopnost narušovat membrány je důležitá v časně fázi infekce pro uvolnění virionů retikula z endoplasmatického retikula a úspěšnou dopravu genomu do jádra. (Huérano et al., 2017). Tato problematika je blíže rozebrána v kapitole 3.3.2.2.



Obrázek 6: **Hydrofobní domény minoritního proteinu VP2 MPyV.** A: Vyznačená poloha hydrofobních domén v sekvenci proteinu VP2, HD1 - hydrofobní doména 1 (oranžová) je unikátní pro protein VP2, HD2 a HD3 - hydrofobní doména 2 a 3 (zelená a modrá) se nachází v sekvenci společně pro VP2 i VP3. B: Sekvence VP2 analyzovaná programem MPEX a vynesena do grafu podle hydrofobicity aminokyselin. Červenou čarou jsou vyznačené predikované hydrofobní domény. Převzato a upraveno z (Huérano et al., 2017)

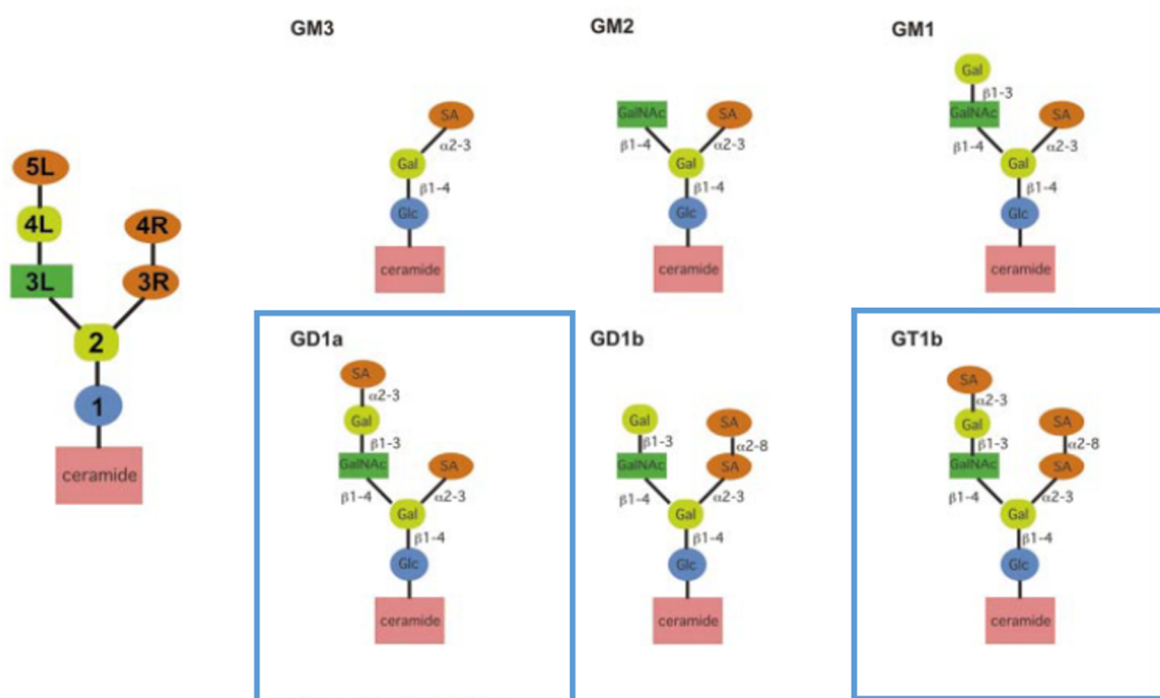
3.3 Doprava genomu polyomavirů do buněčného jádra

Polyomaviry se replikují v jádře. Aby proběhla infekce je třeba, aby byl polyomavirový genom dopraven do jádra. Jakým způsobem jsou viriony cíleny do jádra není zatím zcela objasněno. Produktivní cesta infekce začíná internalizací virionu a pokračuje váčkovým transportem do endoplasmatického retikula (ER), odkud se částečně rozvolněné viriony uvolňují patrně do cytoplasmy a přesouvají se přes jaderné póry do jádra.

3.3.1 Vstup do buňky a doprava virionu do endoplasmatického retikula

Receptory pro polyomaviry jsou gangliosidy. Receptory pro myší polyomavirus jsou GD1a a GT1b, receptorem pro SV40 je GM1. BKV se váže na GD1b a GT1b. Na GT1b se váže rovněž MCPyV (Obrázek 7, Tsai et al., 2003, Low et al., 2006, Erickson et al., 2009). Za vazbu virové částice MPyV na povrch buňky je zodpovědná vazba VP1 na sialovou kyselinu (Caruso et al., 2003b). Tato vazba indukuje konformační změnu VP1 i minoritních proteinů (Cavaladesi et al., 2004). MPyV interaguje žlábkem na povrchu VP1 s poměrně malou částí těchto gangliosidů, konkrétně s kyselinou sialovou a galaktózou spojenými alfa 2,3 glykosidickou vazbou,

umístěnými na koncích jedné z větví gangliosidu (Obrázek 7). Interakce s pouze takto malou částí receptoru, vede k nespecifickým vazbám viru na sialové kyseliny glykoproteinů na povrchu buněk. Tyto nespecifické vazby vedou pouze k velmi nízké úrovni infekce (Tsai et al., 2003). To je způsobeno tím, že virion, který se na povrchu buňky naváže na glykoproteiny je následně směřován do neproduktivního transportu buňkou, který neústí do lumen ER (Qian a Tsai, 2010). Funkce GD1a nespočívá v pouhém navázání virionu na povrch buňky a internalizaci virionu ale také k jeho dalšímu cílení ve váčkovém transportu (Gilbert a Benjamin, 2004). Jako možný koreceptor MPyV byl identifikován integrin $\alpha 4\beta 1$ (Caruso et al., 2003a). Integrin $\alpha 4\beta 1$ má dvě funkce. Jelikož se jedná o sialyzovaný protein, může poskytovat sialovou kyselinu jako nespecifické vazebné místo pro VP1. Zároveň funguje podle autorů práce jako specifický koreceptor. Autoři navrhuji dvourokovou interakci s receptorem. Virion se nejprve naváže na sialovou kyselinu a následně na místo pro ligand receptoru $\alpha 4\beta 1$ (Caruso et al., 2003b, Caruso et al., 2003a).



Obrázek 7: **Struktura gangliosidů.** Na obrázku jsou schématicky znázorněny některé gangliosidy. V modrých obdélnících jsou vyznačeny gangliosidy, které slouží jako receptor pro MPyV. Sialová kyselina navázaná na galaktózu na delším raménku je zodpovědná za vazbu na VP1. SA-sialová kyselina, Glc-galukóza, Gal-galaktóza, GalNAc-N-acetylglaktosamin. Převzato a upraveno z (Tsai et al., 2003).

Po navázání virionů na povrch buňky dochází k internalizaci virionů do hladkých monopinocytických váčků. Jaká je identita těchto váčků není zcela jasné. V myších fibroblastech 3T6 a epitheliálních buňkách jsou tyto váčky odvozeny z membránových raftů

a často obsahují caveolin 1 (Richterová et al., 2001). Jiné práce uvádějí, že viriony nejsou internalizovány kaveolami v myších fibroblastech 3T3 a primárních myších ledvinových buňkách. Nejsou internalizovány ani klatrinovými váčky nýbrž nějakým jiným typem váčků, který k tvorbě nevyžaduje dynamin (Gilbert and Benjamin, 2000, Gilbert et al., 2003). MpyV navíc úspěšně vstupuje i do buněk, které neprodukují caveolín (Liebl et al., 2006). V jedné ze studií bylo pozorováno, že v případě, kdy dojde k endocytose virionu přes receptor GD1a, transport virionu probíhá v kaveolách. Gillbertová s Benjaminem se domnívají, že je virus internalizován v různých typech váčků, v závislosti na tom, jakou molekulu zakončenou sialovou kyselinou naváže (Gilbert a Benjamin, 2004). V tomto ohledu se liší i jednotlivý zástupci čeledi *Polyomaviridae*. Virus SV40 vstupuje do buňky přes kaveoly, virus JCV využívá klatrinových váčků (Pelkmans et al., 2001, Pho et al., 2000).

Viriony MPyV po vstupu do buňky putují do časných endosomů. Později, 3 hodiny po infekci (3 hpi), se část z nich objevuje v recyklujících endosómech (Mannová and Forstová, 2003, Liebl et al., 2006). Transport do recyklujících endosomů nicméně nepřispívá k produktivní infekci (Zila et al., 2014). Viriony byly také pozorovány v pozdních endozomech a lysozomech (0,5-2 hpi), odkud jsou sortovány do ER pravděpodobně pomocí receptoru GD1a (Qian et al., 2009). Receptor GD1a doprovází virion po celou dobu transportu z plasmatické membrány až do endoplasmatického retikula (Qian a Tsai, 2010).

Některé výzkumy ukazují, že pro úspěšný průběh infekce je potřeba, aby MPyV prošel kompartmenty se sníženým pH. Pokud bylo zabráněno acidifikaci endosomů v časných fázích transportu, infektivita se výrazně snížila a viriony se více kumulovaly v časných endozomech (Liebl et al., 2006). Podle jiné studie blokace acidifikace endosomů nesnižuje transport do pozdních endosomů, ačkoli snižuje infektivitu (Qian et al., 2009). Podle Qian a kolegů je průchod kyselým pH nutný pro změnu konformace virionu, který je poté více citlivý k procesům v ER, které jsou nutné pro úspěšnou infekci (kapitola 3.3.2.1). Inkubace virionů ve sníženém pH vede k jejich zvýšené citlivosti k proteináze K, trypsínu a extraktraktu z ER, pravděpodobně právě v důsledku změny konformace. (Qian et al., 2009). Podle jedné studie nemá hodnota pH v endosomech na infekci vliv (Gilbert a Benjamin, 2000).

Studium transportu virionů buňkou do jádra je velmi komplikované, protože je složité odlišit produktivní a neproduktivní cesty infekce. MPyV je navíc schopný infikovat široké spektrum buněk a je tedy možné, že využívá více způsobů dopravy k jádru (Dawe et al., 1987). Nicméně je zřejmé, že MPyV je nakonec transportován do ER (Mannová and Forstová, 2003, Gilbert and Benjamin, 2004).

3.3.2 Průchod polyomavirů endoplasmatickým retikulem

ER je pro polyomaviry nesmírně důležitým kompartmentem. Nejedná se pouze o průchozí destinaci na cestě do jádra, při průchodu endoplasmatickým retikulem dochází k výrazným konformačním změnám virionu, na kterých se podílí hostitelské proteiny. Tyto změny jsou zřejmě důležité pro následný únik z ER. Rozvolnění kapsidy je ale samozřejmě také nutné pro zpřístupnění virové DNA pro její expresi. Ke konformačním změnám postupně dochází během celé cesty do jádra, jak bylo popsáno již v minulé kapitole.

Stále více se ukazuje, že na úspěšné infekci se podílí velké množství hostitelských proteinů lokalizovaných v ER. Mnoho z nich se účastní kontroly kvality nově syntetizovaných proteinů a s endoplasmatickým retikulem spojené degradační (ERAD) dráhy. ERAD dráha slouží k rozeznání nevratně špatně složených proteinů a jejich degradaci v cytosolu. Brání tím jejich akumulaci v ER. Proteiny ERAD dráhy zajišťují transport těchto chybných proteinů přes membránu ER do cytosolu (Dupzyk and Tsai, 2016, review).

3.3.2.1 Strukturní změny virionů v endoplasmatickém retikulu

Virus SV40 je během infekce uvolňován do lumen ER (Inoue and Tsai, 2011, Geiger et al., 2011). V ER dochází ke konformačním změnám SV40. V některých případech bylo pozorováno, že velikost virionů SV40 se v ER zmenšuje (Geiger et al., 2011). V jiných případech nikoli (Inoue et al., 2015).

Část virionů (15 - 30%) izolovaných z ER má nepravidelný tvar (Inoue et al., 2015). Je možné sledovat postupné přeskupení disulfidických můstků VP1 SV40 (Inoue a Tsai, 2011). Dochází k uvolňování vazeb mezi pentamery VP1 v kapsidě. Vazby mezi pentamery jsou nahrazeny intramolekulárními disulfidickými můstky v rámci VP1. Tuto izomeraci zajišťuje protein endoplasmatického retikula ERp57. Pokud je zamezeno produkci tohoto proteinu, infektivita SV40 je snížena (Schelhaas et al., 2007). Na účinné infekci SV40 a rozvolňování jeho kapsidy v ER se kromě ERp57 podílí i další proteiny rodiny disulfid izomeráz ERdj5 a PDI. ERdj5 nejspíše redukuje disulfidické můstky VP1 a PDI se asi účastní rozbalování virionu (Schelhaas et al., 2007, Inoue et al., 2015). Tyto proteiny se společně podílejí na strukturních změnách virionů pozorovaných prostřednictvím elektronové mikroskopie (Inoue et al., 2015). Protein PDI se v buňce účastní ERAD dráhy. Zajišťuje rozbalení špatně složených proteinů a podílí se tak na jejich retrotranslokaci ven z ER. To bylo experimentálně ukázáno na cholera toxinu, který se často používá jako model pro studování retrotranslokace z ER (Forster et al., 2006).

Bylo pozorováno, že v ER dochází k zpřístupnění minoritních proteinů SV40 pro protilátky (Norkin et al., 2002). Je vysoce pravděpodobné, že k exponování minoritních proteinů, které jsou v intaktním virionu ukryty v kapsidě, dochází v důsledku výše popsaných změn.

Podobné změny podstupuje i MPyV. Změny tvaru virionů při inkubaci v lumenálním extraktu z ER byly pozorovány pomocí elektronové mikroskopie (Huérfino et al., 2017). Inkubace virionů MPyV s extraktem z ER vede ke konformační změně virionů, která zpřístupňuje C koncovou část VP1 (Magnuson et al., 2005). Ten se normálně zanořuje do sousední kapsomery a stabilizuje tak strukturu kapsidy (Stehle et al., 1994 v Magnuson et al., 2005). Jedním z ER proteinů, který se podílí na této konformační změně je ERp29. Dominantně negativní mutanta ERp29 snižuje infektivitu MPyV (Magnuson et al., 2005). Na konformační změně C konce VP1 *in vitro* spolupracují s ERp29 rovněž proteiny PDI a ERp57. ERp57 izomerizuje disulfidické můstky VP1. PDI a ERp72 je redukuje (Walczak a Tsai, 2011). Inkubace virionů s lumenálním extraktem z ER vede též k vystavení minoritního proteinu VP2 (Rainey-Barger et al., 2007).

Během infekce BKV také dochází k rozvolňování vazeb VP1, zda k tomu dochází v endoplasmatickém retikulu ale nebylo ukázáno (Jiang et al., 2009).

3.3.2.2 Funkce minoritních proteinů polyomavirů při průchodu endoplasmatickým retikulem

Aby mohlo dojít k expresi virových proteinů a k replikaci viru, musí polyomavirus překonat membránu ER, a dopravit se do jádra.

Jak bylo probráno v kapitole 3.2.1, minoritní proteiny MPyV mají schopnost vázat se do membrán *in vitro* i *in vivo*. V endoplasmatickém retikulu dochází k vystavení minoritních kapsidových proteinů na povrch částečně rozvolněné virové částice. Nabízí se tedy možnost, že se virion zanořuje do membrány ER jejich prostřednictvím. Tato hypotéza byla testována *in vitro*. Inkubace virionu s lumenálním extraktem ER a ERp29 zvyšovala schopnost virionů MPyV vázat se do membrány liposomů. Jelikož se VLPs tvořené pouze proteinem VP1 na liposomy po inkubaci s ER extraktem nevážou, je zřejmé, že tuto vazbu zprostředkovávají minoritní proteiny (Magnuson et al., 2005). Později bylo demonstrováno, že MPyV ošetřený extraktem z ER nabohaceným o ERp29 perforuje mikrosomy tvořené membránou ER (Rainey-Barger et al., 2007). Za vazbu virionu do membrány ER se ukázaly být zodpovědné hydrofobní domény minoritních proteinů. Pokud je hydrofobní doména 1 (unikátní pro VP2) nebo 2 (společná pro VP2 a VP3) mutována, dochází k výraznému snížení interakce viru s membránou

ER v časně fázi infekce. Mutace v hydrofobní doméně 2 vede ke ztrátě infekтивности viru. Mutace v hydrofobní doméně 1 zpomaluje infekci (Huérfano et al., 2017).

Minoritní proteiny SV40 se také váží do membrány ER (Daniels et al., 2006a). Viriony SV40 inkubované s extraktem z ER se stejně jako v případě MPyV vážou na liposomy. Virům podobné částice (VLP), které neobsahují minoritní proteiny, se na liposomy nevážou. Částice VLP jsou úspěšně dopraveny do ER, ale nedochází k jejich přenosu do cytosolu (Geiger et al., 2011). Viriony SV40, které neobsahují minoritní protein VP3 nejsou přenášeny z ER do cytosolu s takovou účinností jako virus divokého typu a rovněž nejsou schopny účinně infikovat buňku (Inoue and Tsai, 2011, Daniels et al., 2006a). I v případě viru SV40 byly identifikovány hydrofobní domény minoritních proteinů zprostředkující vazbu do membrán. Mutace v těchto doménách také vede ke snížení infekтивности viru (Giorda et al., 2013). Velmi zajímavá je hydrofobní doména 1, která se nachází na N konci proteinu VP2 SV40. V té se nacházejí, kromě aminokyselin s hydrofobním charakterem i dvě záporně nabitě aminokyseliny D10 a E17, které jsou v čeledi *Polyomavirae* konzervované. Přítomnost aminokyseliny s nabitým charakterem v pozici 17 je nezbytná pro zachování infekтивности viru SV40 (Geiger et al., 2011, Giorda et al., 2013). Giorda s kolegy se domnívá, že nabitý charakter v této oblasti proteinu VP2 je zásadní pro interakci s hostitelskými proteiny v membráně ER.

3.3.2.3 Role hostitelských proteinů při průchodu polyomavirů endoplasmatickým retikulem

Chaperon BiP je jeden z významných členů ERAD dráhy, který je také důležitým regulátorem stresové signalizace (Dudek et al., 2009, review). Degradace, nebo snížení produkce tohoto chaperonu v infikovaných buňkách vede k tomu, že SV40 neproniká do cytoplasmy z ER (Geiger et al., 2011, Goodwin et al., 2011). BiP se v ER s asistencí svého kochaperonu DNAJ B11 (ERdj3) váže na viriony (Goodwin et al., 2011). Snížení produkce proteinu ERdj5, který se podílí na rozvolňování virové kapsidy, vede k nižší vazbě BiP na virion (Inoue et al., 2015). Samotný BiP se nepodílí na rozvolňování disulfidických můstků v kapsidě virionu (Goodwin et al., 2011). Na jeden virion se váže přibližně 37 molekul BiP. Virion obalený BiP ztrácí schopnost vázat se do membrán, nejspíše proto, že BiP blokuje přístup k hydrofobním oblastem minoritních proteinů. Protein Grp170, který má funkci NEF (nucleotide exchange factor, faktor pro výměnu nukleotidů), indukuje záměnu BiP-ADP za BiP-ATP *in vitro* (Inoue a Tsai, 2015). BiP s navázaným ATP má nižší afinitu k substrátům než BiP s navázaným ADP (Dudek et al., 2009, review). Grp170 zprostředkovává v přítomnosti ATP odpojení chaperonu BiP z virové částice. Pokud je snížena produkce proteinu Grp170 v buňce, SV40 je více vázáno s BiP,

přesouvá se méně efektivně do cytosolu a má nižší infektivitu. Úspěšnost infekce BKV je rovněž závislá na tomto faktoru. Inoue a Tsai se domnívají, že BiP maskuje hydrofobní oblasti VP2 a VP3 a brání tak agregaci částečně rozvolněných virionů s dalšími hydrofobními proteiny v ER. Aby se virion mohl zanořit do membrány je třeba aby se od něj BiP odpojil. To zajišťuje Grp170 (Inoue a Tsai, 2015).

Také „silencing“ dalšího ER proteinu - Sel1L vedl ke snížení infekivity SV40 (Schelhaas et al., 2007). Sel1L je protein, který v ERAD dráze slouží jako adaptor mezi lektiny rozeznávajícími a vázajícími špatně složené proteiny a retrotranslokačním komplexem v membráně ER (Christianson et al., 2008, Cormier et al., 2009).

Další protein ERAD dráhy, který se podílí na infekci SV40 je derlin 1. Snížení jeho produkce vede ke snížení infekivity SV40 (Schelhaas et al., 2007). Podobný vliv má derlin 1 i na BKV. Jeho dominantně negativní mutanta snižuje hladinu infekce. Hlavní kapsidový protein VP1 vyvazuje derlin 1 z buněčného extraktu (Jiang et al., 2009).

Na efektivitu MPyV má vliv také snížení produkce nebo exprese dominantně negativní mutanty derlinu 2. MPyV je v infikovaných buňkách produkujících negativně dominantní mutantu derlinu 2 zadržován v ER. Derlin 2 se tedy účastní translokace MPyV do cytosolu (Lilley et al., 2006). Snížení produkce derlinu 1 také vede ke snížení infekivity MPyV v myších fibroblastech, nikoli však v krysích buňkách (Lilley et al., 2006, Primi, 2012, studentská práce). Derliny jsou membránové proteiny, které jsou spolu s dalšími ER proteiny součástí retrotranslokačního komplexu ERAD, který zajišťuje přenos špatně složeného proteinu do cytosolu. Derliny interagují s ERAD substráty a účastní se degradace některých špatně složených proteinů (Oda et al., 2006, Ye et al., 2004, Huang et al., 2013).

Prostřednictvím „siRNA screening“ byly odhaleny transmembránový protein BAP31 a jeho homolog a interakční partner BAP29 jako ER proteiny, které hrají roli v infekci viru SV40. BAP31 není potřebný k rozvolnění kapsidy virionu v ER, ale účastní se translokace SV40 přes membránu. BAP31 a BAP29 během infekce mění svojí lokalizaci a shlukují se (Geiger et al., 2011). BAP31 fyzicky interaguje s virionem. Interakce mezi virionem a BAP31 je snížena pokud je v buňce snížena produkce proteinů PDI a ERdj5, které se podílí na rozvolňování kapsidy (Inoue et al., 2015). Studium série mutant BAP31 a SV40 mutovaných v N koncových nabitých aminokyselinách proteinu VP2 naznačují, že by spolu tyto proteiny mohly interagovat v membráně prostřednictvím nabitých aminokyselin (Geiger et al., 2011). BAP31 je multifunkční protein, který se účastní kontroly kvality nově syntetizovaných proteinů v ER a

jejich třídění. Kromě toho se účastní i apoptické signalizace a komunikace mezi ER a mitochondrií (Wang et al., 2008, Breckenridge et al., 2003). Role BAP31 v třídění proteinů se dá ilustrovat například na účasti BAP31 v exportu hlavního histokompatibilního komplexu první třídy (MHC1) z ER do Golgiho aparátu (Ladasky et al., 2006). V endoplasmatickém retikulu BAP31 interaguje s proteiny retrotranslokačního komplexu, včetně derlinu-1. V rámci buněčného systému kontroly kvality váže nově syntetizované transmembránové proteiny a jedná-li se o substráty ERAD, tak je navádí k translokaci z ER (Wang et al., 2008). Pokud dojde k akumulaci špatně složených proteinů v důsledku inhibice proteazomu, je možné sledovat přesun BAP31 do subkompartmentů ER v blízkosti jádra, ve kterých se akumuluje spolu se substráty ERAD a dalšími členy buněčné kontroly kvality proteinů (Wakana et al., 2008, Geiger et al., 2011). Dojde-li k takové situaci během infekce SV40, BAP31 přestává kolokalizovat s VP1 (Geiger et al., 2011). Přítomnost BAP31 v buňce je také nezbytná pro účinnou infekci MPyV (Geiger et al., 2011, Primi, 2012, studentská práce).

Aby mohly viriony SV40, BKV a MPyV úspěšně vstoupit do buněčného jádra a pomnožit se vyžadují buněčné kochaperony DNAJ B12, DNAJ B14 a DNAJ C18 (Goodwin et al., 2011, Primi, 2012, studentská práce). Tyto proteiny jsou, podobně jako derliny a BAP31/29, nutné k úniku virionů z ER (Goodwin et al., 2011). DNAJ B12 a DNAJB14 jsou membránové ER proteiny, které spolu tvoří komplexy (Sopha et al., 2012, Goodwin et al., 2011, Walczak et al., 2014). Infekce SV40 indukuje změnu lokalizace DNAJ B12, B14 a C18, ty tvoří shluky, ve kterých „kolokalizují“ s virovými proteiny. DNAJ proteiny se shlukují ve stejných místech jako BAP31. Formace těchto klastrů je závislá na přítomnosti proteinu DNAJ C18 a rovněž na kapsidovém proteinu VP3. Protein DNAJ C18 interaguje s proteinem BAP31, který je v kontaktu s komplexem DNAJ B12 a B14 (Walczak et al., 2014, Bagchi et al., 2015). DNAJ B14 podněcuje degradaci membránových ERAD substrátů (Sopha et al., 2012).

DNAJ C18 interaguje s proteinem EMC1 (podjednotka 1 komplexu ER membránových proteinů) (Bagchi et al., 2016). EMC1 je členem membránového komplexu EMC, který interaguje se členy ERAD dráhy včetně derlinu. Funkce tohoto komplexu v ERAD není známa (Christianson et al., 2011). EMC komplex drozofily stabilizuje nově syntetizované proteiny, které několikrát procházejí membránou (Satoh et al., 2015). Důležitost podjednotky EMC1 byla popsána pro produktivní infekci SV40 a BKV. Je to další z řady proteinů, který se podílí na translokaci SV40 do cytosolu. Podobně jako BAP31 a DNAJ proteiny se v důsledku infekce akumuluje do shluků, označovaných jako „foci“. EMC1 váže částečně rozvolněný SV40. K vazbě dochází v době, kdy SV40 prochází membránou ER, později se tato interakce vytrácí.

Vazba mezi EMC1 a SV40 je nejspíše zprostředkované elektrostatickými interakcemi na kterých se podílí transmembránová doména EMC1 a virové minoritní proteiny VP2/VP3 ale i VP1 (Bagchi et al., 2016). Tento typ interakce připomíná interakce mezi BAP31 a SV40 (Geiger et al., 2011). EMC1 stabilizuje viriony *in vitro* po jejich inkubaci s faktory rozvolňujícími kapsidu. V buňkách, ve kterých je snížena produkce EMC1 dochází k zvýšení rozpadu virionů v ER. EMC1 tedy stabilizuje viriony v ER membráně tak, aby nedocházelo k předčasnému rozpadu kapsidy (Bagchi et al., 2016).

RMA1 je E3 ubikvitin ligáza, která se za spolupráce dalších ubikvitin ligáz účastní degradace ERAD substrátu. RMA1 interaguje a spolupracuje s derlinem 1, BAP31 a některými dalšími členy ERAD dráhy (Morito et al., 2008, Younger et al., 2006, Wang et al., 2008). Funkcí ubikvitin ligáz v ERAD dráze je označovat proteiny ubikvitinem k degradaci v proteazomu. Pokud je produkce RMA1 snížena, dojde překvapivě k snížení infekivity SV40 (Geiger et al., 2011). Zda je virus během průchodu ER ubikvitinylován není známo. RMA1 nicméně může mít funkci i jako interakční partner, který pomáhá skládání a udržení retrotranslokačního komplexu tvořeného dalšími členy ERAD.

3.3.3 Vstup polyomaviru do cytosolu

Virion zanořený do membrány ER musí být následně vytažen do cytosolu. Tohoto procesu se kromě řady výše popsaných membránových proteinů účastní i cytoplasmatický komplex chaperonu Hsc70 a jeho kochaperonů.

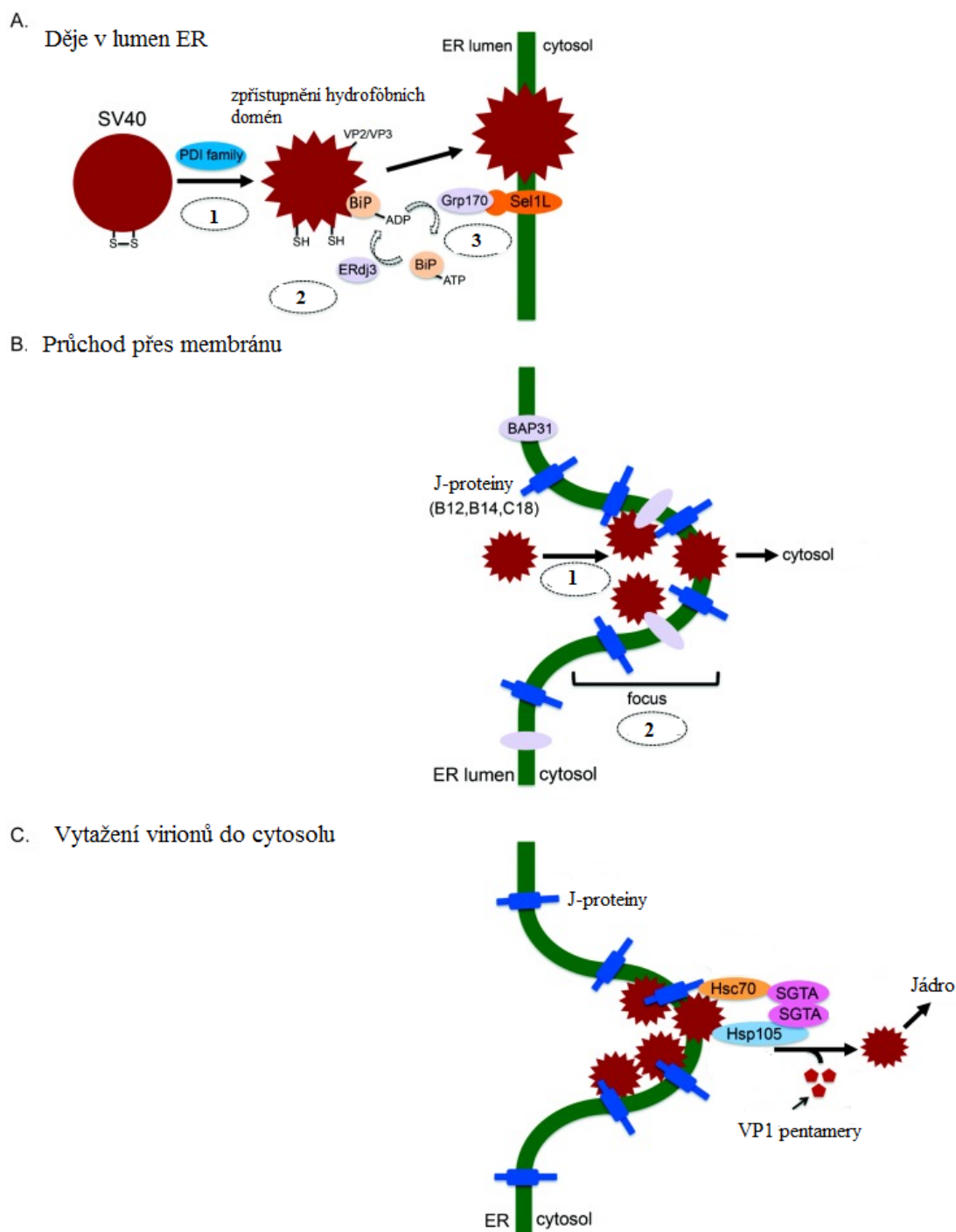
Hsc70 se podílí na přenosu virionu z ER do cytosolu (Dupzyk et al., 2017). V neinfikovaných buňkách tvoří Hsc70 stálé komplexy s DNAJ B12 a DNAJ B14. Prostřednictvím Hsc70 je k nim navázán protein SGTA. SGTA je nezbytný pro úspěšnou polyomavirovou infekci. Snížení produkce SGTA inhibuje infekci SV40 a BKV a stejně jako v případě Hsc70, snižuje přenos virionů do cytosolu. Během infekce, v době, kdy SV40 prochází ER, dochází k odpojování proteinu SGTA z komplexu DNAJ proteinů a k jeho navázání na viriony SV40 v cytosolu. (Walczak et al., 2014, Bagchi et al., 2015). Hsc70 má také schopnost interagovat s virionem. Tato interakce je negativně regulována kochaperonem SGTA (Dupzyk et al., 2017). Aby došlo k vazbě Hsc70 a SGTA na virion a SV40 byl úspěšně vytažen z membrány je třeba strukturní stabilizace virionu v membráně prostřednictvím výše zmíněného EMC1 (Bagchi et al., 2016).

Hsc70, jakožto chaperon rodiny Hsp70, je regulován jak J proteiny, které podporují ATPázovou aktivitu chaperonů, tak také NEF faktorem, který zajišťuje výměnu ADP za ATP a tím reguluje

afinitu chaperonu k substrátu (Bracher and Verghese, 2015, review). Jedním z NEF faktorů je protein Hsp105. Hsp105 je interakční partner chaperonu Hsc70 a DNAJB14. Na protein DNAJB14 se váže přes jeho J doménu. V důsledku infekce SV40 dochází k zvýšení množství Hsp105 vázaného na DNAJB14. Aktivita NEF proteinu Hsp105 podporuje infekci SV40 a BKV při uvolnění virionů do cytosolu. Hsp105 se podobně jako SGTA váže na SV40 v době, kdy viriony vstupují do cytosolu. Hsp105 společně s Hsc70 a DNAJB14 působí rozvolnění virové kapsidy a uvolňování jednotlivých pentamerů VP1. Tento proces vyžaduje energii v podobě ATP (Ravindran et al., 2015).

Je možné, že mechanismus uvolnění virionu do cytosolu z membrány spočívá právě v dalším rozložení již částečně rozvolněné kapsidy (Ravindran et al., 2015). Ačkoli ke změnám vazebných poměrů proteinů VP1 dochází již v ER, k výrazným strukturním změnám dochází právě v cytosolu. Protilátky proti VP1 SV40 nekoimunoprecipitují minoritní kapsidové proteiny, což ukazuje na rozvolnění virionu a uvolnění VP2 a VP3 z komplexu s pentamerem VP1 (Inoue a Tsai, 2011). V cytosolu se nacházejí volné pentamery VP1 SV40 i BKV (Inoue and Tsai, 2011, Bennett et al., 2013). Na snímcích z elektronové mikroskopie je možné pozorovat různým způsobem zdeformované a částečně rozložené částice (Inoue a Tsai, 2011). Experimenty *in vitro* ukazují, že k odloučení pentamerů z virové částice, u které došlo k přeskupení disulfidických můstků, je možné až po odebrání vápenatých iontů stabilizujících kapsidu (Schelhaas et al., 2007). Cytosol je prostředí s nízkou koncentrací vápenatých iontů. K rozvolnění kapsidy zároveň přispívá trojice proteinů DNAJB14, Hsc70 a Hsp105, nejspíše mechanicky (Ravindran et al., 2015).

Při depleci jakéhokoli z trojice proteinů Hsp105, Hsc70 a SGTA dochází k zvýšené tvorbě „foci“ tvořené BAP31 a VP1 a to nejspíše v důsledku akumulace virionů v ER (Dupzyk et al., 2017, Ravindran et al., 2015).



Obrázek 8: **Model průchodu polyomavirů endoplasmatickým retikulem.** A: Strukturní změna v lumen ER a vazba virionu do membrány. 1: Proteiny rodiny disulfid izomeráz (PDI) způsobí strukturní změnu virionu. Dochází k zpřístupnění hydrofobních virových proteinů VP2/VP3. 2: Na virion se ve spolupráci s ERdj3 váže chaperon BiP, který brání interakcím s dalšími hydrofobními proteiny a s viriony. 3: V blízkosti membrány Grp170 vyměňuje ADP navázané na BiP za ATP, čímž snižuje afinitu BiP k substrátu. Hydrofobní domény jsou zpřístupněny a mohou se zanořit do membrány. B: Průchod membránou. 1: Virion se prostřednictvím minoritních proteinů váže do membrány, kde interaguje s BAP31 a řadou membránových proteinů, mezi kterými jsou DNAJ B12, B14, C18, EMC1. 2: Dochází k akumulaci virionů a membránových proteinů v shlucích nezývaných „foci“ C: Virion je uvolněn do cytosolu. DNAJ proteiny interagují na cytosolické straně membrány s komplexem Hsc70-SGTA-Hsp105. Tento chaperonový komplex se v cytoplasmě váže na virion, rozvolňuje ho a napomáhá jeho uvolnění z membrány ER.

Ačkoli některé aspekty přenosu virionu přes membránu ER zůstávají neobjasněné, díky intenzivnímu studiu v předchozích letech máme nyní představu o tom, jak tento proces může fungovat a jaké hostitelské proteiny se na něm podílí (Obrázek 8). Únik z ER do cytosolu byl intenzivně studován na modelovém zástupci polyomavirů - SV40. Znalosti u dalších zástupců této čeledi jsou nicméně malé. Experimenty s MPyV byly obvykle omezeny pouze na studium infekitivity v buňkách se sníženou produkcí některého z buněčných faktorů. Odlišnosti ve vlastnostech kapsidových proteinů a dosud známé poznatky o interakci virionů s proteiny ER nicméně naznačují, že tento proces může být u MPyV odlišný od mechanismu popsaného pro SV40. Tato oblast biologie polyomavirů si tedy zaslouží další pozornost.

3.3.4 Vstup do jádra

Viriony SV40 injikované do cytoplasmy se během 1-2 hodin přesouvají do jádra. Pro vstup používají jaderný pór (Clever et al., 1991). Pokud jsou jaderné póry během časně fáze infekce SV40 zablokovány protilátkou, nedochází k produkci LT antigenu, což naznačuje, že virový genom nebyl doručen do jádra. Viriony byly navíc pozorovány uvnitř a v okolí jaderných pórů pomocí elektronové mikroskopie (Yamada a Kasamatsu, 1993). Samotná virová DNA nebo virová DNA vázaná v komplexu s histony injikovaná do cytoplasmy se do jádra přesouvá velmi neúčinně. Aby byl transport účinný je třeba, aby byla DNA asociovaná se strukturními proteiny (Nakanishi et al., 1996). VP1 i VP3 viru SV40 vážou *in vitro* buněčné importiny $\alpha 2/\beta$, nicméně, pokud je hlavní kapsidový protein v komplexu s DNA, s importiny neinteraguje. Je tedy možné, že pokud je transport virionů do jádra zprostředkovaný buněčnými importiny, pak je to zajištěno jejich interakcí s minoritními kapsidovými proteiny. Protilátka proti importinům neimunoprecipitovala spolu s importiny částice SV40, jehož minoritní proteiny měly mutace v NLS. Zároveň takto mutovaný virus byl defektní v dopravení virové DNA do jádra (Nakanishi et al., 2002). Na virion se během infekce postupně váže nejprve importin alfa a následně importin beta. Viriony, na které jsou navázány oba importiny mají pozměněnou strukturu a jsou rozvolněné natolik, že je DNA přístupná pro DNazu (Nakanishi et al., 2007). K výrazným strukturním změnám virionu dochází během infekce po uvolnění virionu z ER do cytosolu (bližší popis v kapitole 3.3.3).

VLPs viru JC tvořené pouze proteinem VP1 rovněž vstupují do jádra jaderným pórem a interagují s importinem alfa i beta. V případě, že je mutována NLS sekvence proteinu VP1, VLPs do jádra téměř nevstupují (Qu et al., 2004). Samostatně produkované minoritní proteiny BKV mutované v NLS sekvenci nevstupují do jádra, nicméně jsou-li produkovány společně s nemutovaným VP1, dochází k jejich transportu. U transportu virionů obsahující DNA do jádra

je situace odlišná. Mutace v NLS sekvenci minoritních proteinů snižuje infektivitu viru, i v případě, že NLS proteinu VP1 není mutován. Také v případě BKV byla prokázána závislost infekce na importinech. Zablokování transportu do jádra prostřednictvím importinu α/β vedlo k snížení infekitivity u nemutovaného BKV, a také k dalšímu snižování infekitivity BKV mutovaného v NLS minoritních proteinů. Je tedy možné, že na transportu do jádra prostřednictvím importinů se podílí nějaká další sekvence (například NLS VP1) (Bennett et al., 2015).

Tyto výzkumy ukazují, že na transportu virionů do jádra přes jaderný pór se podílí NLS minoritních proteinů. NLS hlavního kapsidového proteinu SV40 se tohoto procesu nejspíš neúčastní, pravděpodobně proto, že je v kapsidě blokován vazbou k DNA. NLS hlavního kapsidového proteinu se patrně uplatňuje pouze při přenosu komplexů kapsidových proteinů do jádra k morfogenesi virionů.

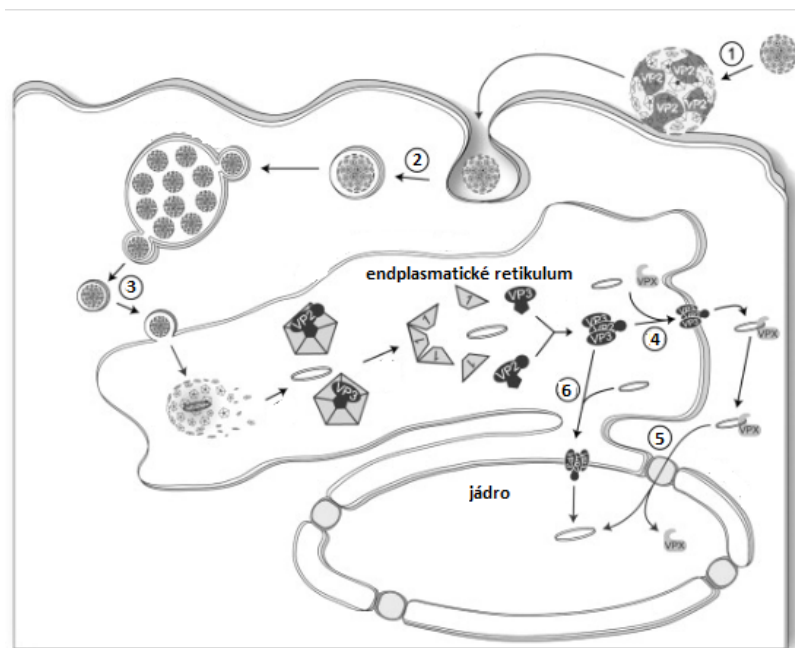
Minoritní kapsidové proteiny MPyV jsou kratší než VP2 a VP3 SV40 či lidských polyomavirů, které mají na C konci dva oddělené úseky bazických aminokyselin, zatímco VP2 a VP3 MPyV pouze jeden. Tento C-koncový úsek bazických aminokyselin byl identifikován jako NLS pro VP2 a VP3 MPyV (Chen et al., 1998, Chang et al., 1992, Moreland and Garcea, 1991). Zda je při infekci virový genom MPyV doručen do jádra přes jaderný pór pomocí importinů interagující s NLS sekvencí minoritních proteinů, není známo. Studium tohoto procesu je komplikované tím, že sekvence kódující NLS na C konci minoritních proteinů se překrývá se sekvencí kódující NLS na N konci proteinu VP1. Mutace v genomu v této sekvenci tedy vede ke změně sekvence kódující NLS všech strukturních proteinů.

Protein SGTA, který se podílí na přenosu virionu z ER do cytosolu a který reguluje vazbu Hsc70 na virion, má patrně také zatím neznámou funkci v infekci po uvolnění virionu do cytoplasmy (Dupzyk et al., 2017). Tento protein je schopen se přemístit také do jádra (Yin et al., 2006). Dupzyk s kolegy navrhli hypotézu, že by se mohl nějakým způsobem podílet na transportu polyomavirového genomu do jádra (Dupzyk et al., 2017).

3.3.5 Alternativní doprava genomu do jádra

Ačkoli dosavadní výzkumy ukazují, že hlavní produktivní cesta infekce polyomaviry vede z endoplasmatického retikula přes membránu do cytosolu a následně transportem přes jaderný pór do jádra, je možné, že jsou polyomaviry schopny vstupovat do jádra i alternativní cestou. Podle jednoho z modelů, by mohly viriony vstupovat do jádra přímo z ER přes jadernou membránu (Obrázek 9, Daniels et al., 2006a). Tento model je podpořen některými starší prací

ve které byly elektronovou mikroskopií, zachyceny viriony v jádře v blízkosti jaderné membrány mimo dosah jaderných pórů (Mackay a Consigli, 1976) . Při infekci SV40 bylo pozorováno, že v době, kdy virus vstupuje do jádra dochází k deformaci membrány a ke změně tvaru jádra. Dochází také k snížení množství laminu A a laminu C v buňce (Butin-Israeli et al., 2011). Velice zajímavé je, že důsledkem nadprodukce buněčných proteinů DNAJ B12 a DNAJ B14, které se účastní přechodu virionů z ER do cytosolu (kapitola 3.3.2.3), dochází k tvorbě membránových vchlípenin do jádra, které byly nazvány DJANGOS. V těchto útvarech se nacházejí markery ER a jaderné membrány. DJANGOS jsou tvořeny tubulárními strukturami z jednovrstevné membrány nebo soustřednými kružnicemi. DJANGO vznikají z váčků s dvojitou membránou navazující na vnější i vnitřní jadernou membránu. Obsahují atypické jaderné póry, přes které se nejspíše membrány vchlipují dovnitř jádra (Goodwin et al., 2014). Zda mají tyto útvary biologický význam není jasné, naznačují ovšem, že DNAJ proteiny mají schopnost manipulovat s membránou ER, a mohly by mít význam i pro případnou alternativní cestu viru do jádra přímo z ER.



Obrázek 9: **Alternativní model dopravy genomu do jádra.** 1: Virion se váže na receptory na cytoplasmatické membráně. 2: Dochází k internalizaci virionu do váčku. 3: Virion vstupuje do endoplasmatického retikula a dochází k jeho rozvolnění. 4: Virion opouští pomocí minoritních proteinů ER. (Na obrázku je znázorněn pouze genom, dnes ale víme, že virion opouští ER jako částice). 5: Rozvolněná částice vstupuje do jádra přes jaderný pór. 6: alternativně dochází k přenosu přes vnitřní jadernou membránu přímo z lumen ER. Obrázek převzat a upraven z (Daniels et al., 2006a).

4 Cíle práce

Dlouhodobým zájmem naší laboratoře je studium dopravy virového genomu do jádra. Kromě váčkového exportu se zabýváme i problematikou úniku virionů z ER a následnou dopravou do jádra. Intenzivní studiu viru SV40 vedlo k zjištění, že na translokaci virionů přes membránu ER se podílí řada hostitelských proteinů. U některých z nich bylo ukázáno, že jsou důležité i pro infektivitu MPyV, jejich způsob interakce a mechanismus kooperace však studován nebyl. Naším cílem je:

➤ **Příspěvek k rozšíření znalostí o vztazích mezi MPyV s vybranými hostitelskými ER proteiny**

Specifické cíle zahrnují:

Zjistit, zda během časně fáze infekce dochází ke kolokalizaci proteinu VP1 a kochaperonu DNAJ B14. Zjistit, zda infekce MPyV indukuje změnu lokalizace DNAJ B14. Pokud dochází ke kolokalizaci a tvorbě „foci“ VP1/DNAJ B14, sledovat jejich výskyt v průběhu časně fáze infekce.

Ověřit, že během časně fáze infekce dostávají do vzájemné blízkosti kapsidový proteinu VP1 a chaperon BiP.

Nedávno jsme ukázali, že pro úspěšnou infekci je důležitá interakce minoritních kapsidových proteinů s membránou ER prostřednictvím hydrofobních domén. Výzkum SV40 navíc ukázal, že důležitou roli v infekci mají i konzervované záporně nabitě aminokyseliny na N-konci proteinu VP2. Naším cílem bylo:

➤ **Zjistit, zda D10 a E17 na N-koci VP2 mají vliv na infekci MPyV**

Specifické cíle zahrnují:

Mutovat VP2 MPyV substitucí D10A nebo E17A a připravit mutované viry.

Charakterizovat tyto mutantní viry

Otestovat jaké mají tyto mutace vliv na infektivitu viru.

V naší laboratoři se zabýváme transportem genomu do jádra a rolí jaderných lokalizačních signálů strukturních virových proteinů na tomto procesu. Naším cílem bylo

➤ **Podílet se na přípravě virů mutovaných v NLS kapsidových proteinů pro studium mechanismu transportu MPyV do jádra**

Specifické cíle zahrnují:

Vytvořit MPyV s mutovanou NLS sekvencí (v proteinu VP1 K6Q a v proteinu VP2/3 K315A)

Charakterizovat tento virus.

5 Materiál a Metody

5.1 Materiály

5.1.1 Chemikálie

nutrient agar N°2 (**Biolife**)

glycin (**Duchefa biochemie**)

fosfowolframová kyselina – PTA, Tween-20, doexycholát sodný (**Fluka**)

kvasničný autolyzát, pepton pre bakteriologiu (pepton) (**Imuna**)

octan sodný (**MERSK**)

chlorid draselný - KCl, síran hořečnatý – MgSO₄, chlorid hořečnatý - MgCl₂, chlorid vápenatý - CaCl₂, chloroform, bromfenolová modř (**Lachema**)

kyselina chlorovodíková - HCl, kyselina octová, methanol, sacharóza (**Lech-Ner, s.r.o.**)

ethanol 96%, chlorid sodný, isoamylalkohol (**Penta**)

Triton X-100 (**Roth**)

akrylamid, N'N'-methylenbisakrylamid, amonium persulfát, agaróza, Comassie brilliant blue G 250, Bayol F, chlorid cesný - CsCl, ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), tris(hydroxymethyl)aminomethan – Tris, 2-merkapttoethanol (**Serva**)

adenosin trifosfát disodná sůl - ATP, 4,6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid - DAPI, gelatin from porcine skin A - želatina, glukóza, glycerol, sodium dodecyl sulfát - SDS, bovine serum albumin – soviní sérum albumin - BSA, luminol, coumaric acid - kyselina p-kumarová, tetramethylethylenediamine - TEMED, paraformaldehyd - PFA, 30% peroxid vodíku, phenol solution - fenol, DL-dithiothreitol - DTT, NP 40, dimethyl sulfoxide – DMSO (**Sigma-Aldrich**)

Laktino sušené mléko

5.1.2 Antibiotika

Ampicilin (Biomedika, používaná koncentrace 100 µg/ml)

Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma-Aldrich, 100x koncentrovaný roztok obsahuje na 1 ml: 10 000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu, 25 mg amphotericinu B)

5.1.3 Kultivační média

5.1.3.1 Bakteriální média

Luria – Bertani (LB) médium: 1% (w/v) Pepton pro bakteriologii, 1% (w/v) chlorid sodný, 0,5% (w/v) kvasničný autolýzát

Nutrient agar N°2: 4% živný bujon číslo 2

SOC médium: 2% (w/v) pepton pro bakteriologii, 0,5% (w/v) kvasničný autolýzát, 20 mM glukóza, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄

5.1.3.2 Média pro tkáňové kultury

DMEM médium s 10% sérem: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich), 10% fetální bovinní sérum (ThermoFisher Scientific), 1/100 objemu roztoku GlutaMAX (ThermoFisher Scientific), 1/100 objemu směsi antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma-Aldrich) nebo

Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High glucose (Sigma-Aldrich), 10% fetální bovinní sérum (ThermoFisher Scientific), 1/100 objemu směsi antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma-Aldrich)

DMEM médium s 5% sérem: (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 5% fetální bovinní sérum (ThermoFisher Scientific), 1/100 objemu roztoku GlutaMAX (ThermoFisher Scientific), 1/100 objemu směsi antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma-Aldrich)

nebo

Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High glucose (Sigma-Aldrich), 5% fetální bovinní sérum (ThermoFisher Scientific), 1/100 objemu směsi antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma)

DMEM médium bez séra: (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, (Sigma-Aldrich), 1/100 objemu roztoku GlutaMAX (ThermoFisher Scientific), 1/100 objemu směsi antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma-Aldrich)

RPMI + glutamax: Médium RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), 1/100 objemu roztoku GlutaMAX (ThermoFisher Scientific)

Versen: 0,02% EDTA v PBS.

5.1.4 Protilátky

5.1.4.1 Primární protilátky

mouse anti VP1 A5 pro dot blot ředěno 1:10, pro IF ředěno 1:50 (Morávková, 2001, diplomová práce)

mouse anti VP1 D4: myší monoklonální proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 MPyV, pro IF ředěno 1:50 (Morávková, 2001, diplomová práce)

mouse anti PyVP1-A: myší monoklonální protilátka proti hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 MPyV, pro western blot ředěno 1:100 (Forstova et al., 1993)

mouse anti VP2/VP3 1A2: myší monoklonální proti společné části proteinů VP2 a VP3 MPyV, pro IF ředěno 1:2 (Forstova et al., 1993)

mouse anti VP2/VP3 2C8: Myší monoklonální protilátka 2C8 proti společné části proteinů VP2 a VP3 myšího polyomaviru. Pro western blot ředěno 1:5 (Forstova et al., 1993)

rat anti LT 252 TES3: krysí monoklonální proti velkému T antigenu MPyV, pro IF ředěno 1:50 (S. Dilworth, Imperial College School of Medicine, London)

rabbit anti DNAJB14: králičí polyklonální protilátka proti DNAJ B14 (Proteintech Europe, cat.n. 16501-1-AP). Pro IF ředěno 1:200

rabbit anti BIP: Králičí polyklonální protilátka proti Grp78/BiP (Abcam, lot. GR 1274271). Pro IF ředěno 1:1000

Mouse anti Aktin: myší protilátka proti aktinu (Sigma-Aldrich). Pro western blot ředěno 1:2000.

5.1.4.2 Sekundární protilátky (fluorescenčně značené / s konjugovanou peroxidázou)

Goat anti rat 488: kozí protilátka proti krysím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 (Life technologies)

(goat anti rat Cy3): kozí protilátka proti krysím imunoglobulinům konjugovaná s Cy3 (Life technologies, ref. A10522)

Donkey anti mouse 488: oslí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 (Life technologies)

Donkey anti rabbit 546: oslí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546 (Life technologies, ref. A10040)

Goat anti mouse HRP: kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s peroxidázou (Biorad)

Všechny sekundární protilátky byly ředěny 1:1000 není-li uvedeno jinak.

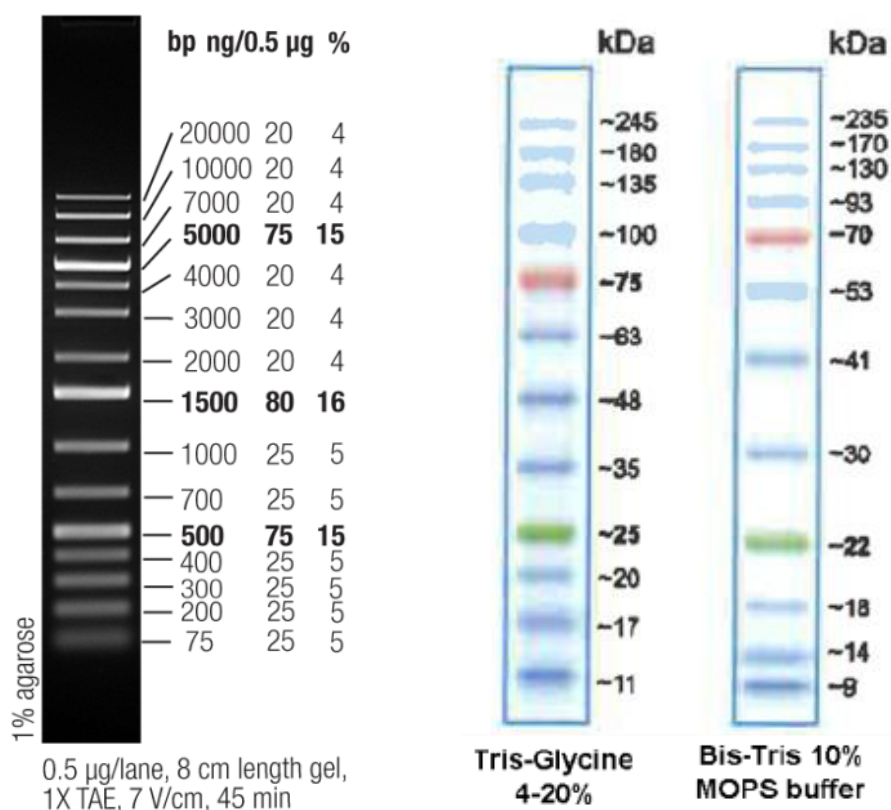
5.1.5 Enzymy a inhibitory

Pfx polymeráza (AccuPrime), *EcoRI* (Fermentas), *XMAJI* (Fermentas), *EHEI* (Fermentas), *T4* ligáza (Fermentas), *Neuraminidáza* (Sigma-Aldrich), *aprotinin* (Sigma-Aldrich), *DNAsa I* (Fermentas), *proteináza K* (Roche), *trypsin* (Sigma-Aldrich), *cOmplete™ ULTRA Tablets*, *Mini*, *EDTA-free*, *EASYpack Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich)

5.1.6 Markery molekulových hmotností

Marker molekulových hmotností pro proteinovou elektroforézu: *Black protein Ladder* (Biosystems)

Marker molekulových hmotností pro DNA elektroforézu : *O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder* (Fermentas)



Obrázek 10: **Markery molekulových hmotností** O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder v 1% agarózovém gelu rozdělen při 7 V/cm po dobu 45 minut (vlevo) a Black protein Ladder při použití dvou odlišných elektroforetických pufů (vpravo). Jedná se o reprezentativní fotografie poskytnuté výrobcí.

5.1.7 Plasmidy

pMJG: vektor plasmidového typu odvozený od plazmidu pMJ1, do kterého byl vložen genom MPyV linearizovaný enzymem v unikátním restrikčním místě pro EcoRI (Krauzewicz et al., 1990)

5.1.8 Primery/oligonukleotidy

Sekvence primerů je vypsána ve směru 5' -> 3'. Nukleotidy nepárující s templátem jsou zvýrazněny červenou barvou. Primery byly vyrobené na zakázku firmou Integrated DNA Technologies.

primery pro mutagenezi

Primery pro mutagenezi N-konce VP2 myšího polyomaviru a vytvoření mutanty E17A.

A50C VP2 mut: CCGTAAGGGTAGACACTG**C**AGCTAATCCCTCGATG

A50C antisense VP2: CATCGAGGGATTAGCTG**C**AGTGTCTACCCTTACGG

Primery pro mutagenezi N-konce VP2 myšího polyomaviru a vytvoření mutanty D10A.

A29C VP2 mut: CACTGACTATTCTAGTAG**C**CCTCATCGAGGGATTAGC

A29C antisense VP2: GCTAATCCCTCGATGAGG**G**CTACTAGAATAGTCAGTG

Primery pro mutagenezi NLS myšího polyomaviru a vytvoření Mutanty 1.

a1236g_a1237: GGAAGATGGCCCCCAAAG**G**CAAAGCGGCGTCTCTA

a1236g_a1237c_antisense: TAGAGACGCCGCTTT**G**CCTTTTGGGGGCCATCTTCC

primery pro sekvenaci

sek_N_VP2: ATTAAAAGAGGATGTCGCAC

LT F 7251: AGCCGGTTCCTCCTAGATTC (používaný i pro real time -PCR)

VP2 NLS: TGCAGCACATATACAGGATGAG

primery pro real-time PCR

primery pro PCR v oblasti genu VP1, produkt o velikosti 260bp

A2mPyV2857F16: GCAAGAAGGCGACGAC

A2mPyV3115B17: TGGCCTCCCTCATAAGT

Primery pro PCR v oblasti genu VP2, produkt o velikosti 251bp

PCR VP2-ENDF: ACCCCTGCAGCACATATACAG

PCR VP2-ENDB: TAAGCAGTTTGGGAACGGGT

Primery pro PCR v oblasti genu LT, produkt o velikosti 211bp

LT F 7251: AGCCGGTTCCTCCTAGATTC

LT R 7442: GCTGACAAAGAAAGGCTGCT

5.1.9 Buněčné linie, bakteriální kmeny a viry

Escherichia coli TOP10, genotyp: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Δ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ^- (Invitrogen)

Escherichia coli DH5 α -T1R (ThermoFisher scientific), genotyp: F- Δ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA

Buněčná linie 3T6: myší fibroblasty 3T6, stabilní linie (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

Myší polyomavirus MpyV kmen BG (dar od B. E. Griffin, Royal Postgraduate School, London)

5.1.10 Komerční soupravy

GENEART Site – Directed Mutagenesis System (ThermoFisher Scientific) Qia prep spin miniprep kit (Qiagen), Jet star endotoxin free plasmid purification kit (Genomed), Pure Quick gel extraction kit (Invitrogen), Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V (Lonza), iQTM SYBR® Green Supermix (Biorad), ABsolute QPCR SYBER green Mix (ThermoFisher Scientific), Duolink® PLA (Sigma-Aldrich) s použitím práb (DUO92002) a (DUO92004)

5.1.11 Komerční roztoky

buffer tango (Fermentas), buffer EcoRI (Fermentas), T4 buffer 10X (Fermentas), 10x loading buffer (Takara), 6x DNA loading dye (ThermoFisher scientific), Red Gel (Biotium), PBS, sample buffer Nu-PAGE® LDS 4x (ThermoFisher scientific), NuPAGE reducing agent 10x (ThermoFisher scientific) NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (ThermoFisher scientific), SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (Molecular Probes, Invitrogen) GelCodeTM Blue Stain Reagent (ThermoFisher Scientific)

5.2 Metody

5.2.1 Práce s tkáňovými kulturami

Pro produkci viru a testování jeho chování v časných fázích infekce byly výhradně použity myši fibroblasty 3T6 (kapitola 5.1.9). Kultivovány byly v humifikovaném termostatu v 5% atmosféře CO₂ při 37°C. Byly pěstovány na polystyrenových kultivačních miskách o velikosti 6 cm nebo 10 cm v průměru, případně v 24 jamkových destičkách.

5.2.1.1 Pasážování

Buňky byly pasážovány po dosažení konfluence, obvykle po 3-4 dnech od předchozí pasáže.

Po kontrole případných kontaminací v kultuře pomocí optického mikroskopu bylo z konfluentně porostlé misky vakuovým systémem odsáto médium a následně byla miska opláchnuta přehřátým roztokem 0,02% versenu (3 ml na Ø 6 cm misku a Ø 5 ml na 10 cm misku). Buňky byly dále inkubovány s roztokem 0,25% trypsinu v PBS po dobu 5 – 10 minut při 37°C v termostatu (270 - 370 µl trypsinu na 6 cm misku, 500 µl na 10 cm misku). Uvolňování buněk z povrchu misky bylo kontrolováno opticky v mikroskopu. Po dosažení optimálního stavu byl trypsin inaktivován desetinásobným objemem přehřátého média DMEM s 10% obsahem séra. Buněčná suspenze byla resuspendována mechanicky protahováním pipetou a následně byla rozdělena do misek či destiček v běžných případech v poměru 1:6 nebo v případě potřeby 1:10. Pro některé experimenty byla pomocí Bürkerovy komůrky (kapitola 5.2.1.2) určena koncentrace buněk v médiu a na misku byl vysazen definovaný počet buněk. Suspenze byla doplněna médiem s obsahem séra (do objemu přibližně 5 ml v případě Ø 6 cm misky, 10 ml v případě Ø 10cm misky a 1 ml na jamku v případě 24 jamkové destičky). Veškerá práce probíhala sterilně v prostředí flowboxu.

V případě kultur s vysokou rychlostí růstu bylo použito médium s 5% sérem.

5.2.1.2 Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Řádně resuspendovaná buněčná suspenze v roztoku inaktivovaného trypsinu a média byla po 15 µl aplikována pod krycí sklo do obou částí Bürkerovy komůrky. Byl zaznamenáván počet buněk vždy ve 24 čtvercích se stranou o velikosti 0,2 mm. Počítány byly pouze buňky uvnitř čtverce a buňky dotýkající dvou vybraných stran tohoto čtverce. Do výpočtu byly zařazeny čtverce horizontálně protínající rastry Bürkerovy komůrky. Průměrný počet buněk v těchto čtvercích odpovídá průměrnému počtu buněk v objemu 1/250mm³ media. Koncentrace buněk v 1 ml byla vypočítávána následovně:

Průměrný počet buněk ve čtverečku o straně 0,2mm x 2,5 x 10⁵

5.2.2 Práce s bakteriálními kmeny

5.2.2.1 Kultivace bakterií

Kultivace bakterií probíhala 16 hodin při 37°C staticky v termostatu na pevném médiu nebo při 37°C a 180-200 rpm na třepačce v tekutém médiu. Za účelem selekce kolonií probíhala kultivace na plotnách s pevným agarozovým médiem (Nutrient agar N°2) s ampicilinem o koncentraci 100µg/ml. Misky s pevným médiem nikdy nebyly připravovány dříve než tři týdny před použitím. Na misky bylo aplikováno 100 µl nebo 300 µl bakteriální kultury v různém ředění (1, 2/10, 1/10, 1/20). Pro namnožení kultury do vyšších objemů bylo použito tekuté Luria – Bertani (LB) médium s ampicilinem o koncentraci 100µg/ml (5 ml pro účel izolace plasmidu miniprepem, 250 ml pro maxiprep). Do média byly bakterie inokulovány buď pomocí párátka s nabraným vzorkem z konzervy či kolonie narostlé na pevném médiu, nebo přidáním tekuté kultury (1/500 objemu). Veškerá média byla před přidáním antibiotika a použitím vysterilizována.

5.2.2.2 Uchovávání bakteriálních kultur

Bakteriální kultury na pevném i v tekutém médiu byly krátkodobě uskladňovány při 4°C. Za účelem dlouhodobého uchování byly vytvořeny konzervy tvořené narostlou bakteriální kulturou s glycerolem o finální koncentraci 20%. Tyto konzervy byly zamrazeny a uskladněny v - 80°C.

5.2.3 Tvorba mutant a práce s DNA a s plasmidy

5.2.3.1 Cílená mutagenese

Cílená mutagenese plasmidu byla prováděna *in vitro* za použití komerční soupravy GENEART Site – Directed Mutagenesis System. Celý proces byl proveden podle návodu a doporučení výrobce. Na jednu reakci bylo použito 20 ng plasmidu a primery navržené pro mutagenesi (kapitola 5.1.8). Délka methylační reakce byla přizpůsobena velikosti plasmidu (7 kb) a trvala 20 minut při 37°C. PCR reakce probíhala v 18 cyklech za přítomnosti výrobcem doporučené polymerázy Pfx (AccuPrime). Délka atenuace byla optimalizovaná pro velikost plasmidu (7 kb) na 3,5 minuty. Rekombinace plasmidu a transformace bakterií probíhali podle návodu. Pro transformaci byl použit kmen *E.Coli* DH5alfa-T1, který je dodáván jako součást komerční soupravy. Transformované bakterie byly přeneseny na selekční pevné medium s ampicilinem v ředění 1, 2/10, 1/10, 1/20 a kultivovány, jak je blíže popsáno v kapitole 5.2.2.1.

5.2.3.2 Transformace E.Coli pomocí elektroporace

Konzervy s kompetentními buňkami *E. Coli* kmene TOP10 byly rozmrazovány na ledu po dobu přibližně šesti minut. K 50 µl kompetentních buněk byly přidány 2 µl (12-13 ng) DNA ligační směsi (kapitola 5.2.3.6) a výsledná suspenze byla jemně promíchána. Následovala minutová inkubace na ledu. Směs byla přenesena do vychlazené elektroporační kyvety a podrobena výboji o 2500 V obvykle po dobu 2,5-3 ms v elektroporátoru (Eporator, eppendorf). K bakteriím byl okamžitě přidán 1ml SOC média temperovaného na laboratorní teplotu. Následovala hodinová inkubace ve 37°C na třepačce při 200 rpm. Transformované bakterie byly následně kultivovány na pevném médiu (kapitola 5.2.2.1)

5.2.3.3 Izolace plasmidů pomocí komerčních souprav

5.2.3.3.1 Minipreparace

Pro izolaci plasmidu minipreparací byl použit komerční Qiaprep spin miniprep kit. Přes noc narostlá kultura *E. Coli* o objemu 5 ml byla centrifugována po dobu 15 min 3214 g Při 4°C. Vzniklý pelet byl použit pro izolaci DNA, která byla provedena podle návodu a doporučení výrobce.

5.2.3.3.2 Maxipreparace plasmidu a odstranění endotoxinů

Pro potřeby získání plasmidu bez přítomnosti bakteriálních endotoxinů a pro přípravu plasmidu ve velkém množství byl použit komerční Jet star endotoxin free plasmid purification kit. Izolace probíhala dle návodu z 250 ml přes noc narostlé kultury *E. Coli*.

5.2.3.4 Měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA v roztoku byla měřena pomocí přístroje nanodrop 2000 a výsledky byly zobrazovány v programu Nanodrop 2000/2000C. K analýze bylo použito o 1,5 – 2 µl roztoku. Měření probíhalo dle instrukcí výrobce.

5.2.3.5 Štěpení restrikčními endonukleázami

Pro restrikční štěpení bylo použito 10 -100 µg DNA a 15 - 60 jednotek enzymu ve 100 – 600 µl reakční směsi. Pufr a reakční podmínky byly zvoleny dle doporučení dodavatele. V případě simultánního štěpení více enzymy v jedné reakci byl pufr zvolen tak, aby byla podpořena aktivita obou enzymů. Konkrétní složení reakčních směsí použitých v této práci bylo následující:

Vyštěpení virového genomu z plasmidu PMJG pomocí EcoRI

100 µg plasmidové DNA

Demi H₂O doplněna tak, aby celkový objem činil 600 µl

60 µl EcoRI buffer 10X

60 U (6 µl) enzymu EcoRI

Reakční směs byla inkubována 3 hodiny v 37°C a následně byla doplněna dalšími 60 U EcoRI. Kompletní směs byla inkubována při stejných podmínkách dalších 16 hodin. Inaktivace probíhala po dobu 20 minut v 65°C. Naštěpená DNA byla analyzována elektroforeticky a uskladněna v -20°C.

Vyštěpení fragmentu z plasmidu PMJG pomocí enzymů EheI a XmaJI

10 µg plasmidové DNA

Demi H₂O doplněna tak, aby celkový objem činil 600 µl

15 U enzymu EheI (SfoI)

15 U enzymu XmaJI (AvrII)

10 µl pufru Tango 10x

Reakční směs byla inkubována 16 hodiny v 37°C. Naštěpená DNA byla analyzována elektroforeticky a uskladněna v -20°C.

5.2.3.6 Ligace

Ligační reakce byla prováděna vždy ve dvou odlišných molárních poměrech vektoru k insertu a to 1:2 a 1:4. V této práci byl použit vektor o velikosti 6985 bp a insert o velikosti 672 bp. Do ligačních reakcí o celkovém obsahu 100 ng DNA bylo tedy použito 84 ng vektoru s 16 ng insertu pro získání molárního poměru 1:2 a 72 ng vektoru s 28 ng insertu v případě molárního poměru 1:4. K roztoku DNA bylo přidáno 5 U (1 µl) T4 ligázy a příslušné množství desetkrát koncentrovaného T4 pufru. Následovala inkubace při laboratorní teplotě po dobu minimálně 16 hodin. Ligáza byla inaktivována ve vodní lázni s teplotou 65°C po dobu 30 minut. Ligovaný plasmid byl transformován do bakterií pomocí elektroporace (kapitola 5.2.3.2).

Podobným způsobem byla provedena i recirkulace virového genomu. V tomto případě bylo použito 50 – 75 µg DNA pro jednu reakci, která probíhala v objemu 10 - 15 ml. Těsně před zahájením reakce byl připraven 10x koncentrovaný ligační pufr. Tento roztok byl přečištěn přes 0,22 µm filtr. Do reakce bylo použito 25 – 37,5 U (5 – 7,5 µl) T4 ligázy. Reakce probíhala za

stejných podmínek jako předchozí a inaktivována byla při 65°C 10 min. Následně byla z roztoku vyprecipitována DNA, která byla transfekována do savčích buněk (kapitola 5.2.4.1).

Ligační pufr 10x: 400 mM Tris pH=7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP

5.2.3.7 Agarózová DNA elektroforéza

Gel pro elektroforézu byl míchán z agarózy a 25 nebo 35 ml pufru TAE, podle požadované velikosti gelu. V případě, že byla analyzována či izolována DNA o velikosti stovek bází, bylo množství agarózy naváženo tak, aby odpovídalo jednomu hmotnostnímu procentu gelu. Pro účely analýzy a izolace DNA o délce tisíců bází byl připraven 0,8% gel. Pufr s agarózou byl opakovaně zahříván dokud nedošlo ke kompletnímu rozpuštění agarózy. Po částečném vychladnutí byl do roztoku přidán GelRed v množství doporučeném výrobcem. Roztok byl nalit do hranolu s připraveným hřebínkem zvoleného typu a byl ponechán tuhnout po dobu 30 minut. Následně byl hřebínek vytažen a hranol s gelem umístěn do elektroforetické aparatury. Gel byl přelit pufrům TAE. Vzorky smíšené s doporučeným množstvím nanášecího pufru 10x loading buffer (TaKaRa) nebo 6x DNA loading dye (ThermoFisher Scientific) byly naneseny do jamek. Takto připravená aparatura byla připojena ke zdroji jednosměrného napětí. Elektroforéza probíhala podle potřeby při 2,5 V/cm nebo 4,4 V/cm po dobu 45 minut až 4 hodin. Vizualizace probíhala prostřednictvím osvětlení UV světlem v transluminátoru.

Pufr TAE: 40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA

5.2.3.8 Izolace DNA z gelu

Vybraná oblast gelu obsahující DNA o zvolené velikosti byla vyříznuta pod UV světlem skalpelem, předem očištěným 70 % etanolem. Z takto získaných segmentů gelu byla DNA izolována komerčním Pure Quick gel extraction kitem. Izolace probíhala podle návodu a doporučení výrobce. Úspěšnost izolace byla zkontrolována elektroforeticky a pomocí nanodropu. Získané roztoky DNA byly uskladněny v -20°C.

5.2.3.9 Precipitace DNA etanolem

K roztoku obsahující DNA byl přidán 3M octan sodný v množství 1/10 finálního objemu (finální koncentrace 0,3M). Po řádném promíchání bylo k roztoku přidáno 2,5 objemu vychlazeného 96% etanolu. Precipitace probíhala v -20°C minimálně 16 hodin. Roztok byl centrifugován při zrychlení 16000 g ve 4°C po dobu 15 minut. Po odstranění supernatantu byl DNA pelet překryt vychlazeným 70% etanolem a opět centrifugován 16000 g ve 4°C po dobu 15 minut. Pelet byl sušen na vzduchu asi 30 minut a následně byl rozpuštěn v přiměřeném množství TE pufru (1 µl na 1 µg DNA).

TE pufr je součástí komerční soustavy Jet star endotoxin free plasmid purification kit.

5.2.3.10 Sekvenace

Roztok pro sekvenační reakci byl míchán tak, aby obsahoval 3-5 ng DNA na každých 100 pb délky testovaného templátu. U nejčastěji testovaného plasmidu PMJG (délka 7657nt) bylo do sekvenační reakce použito 270 ng DNA. Dále bylo použito 5 pmol vybraného primeru (kapitola 5.1.8) a reakce byla doplněna sterilní ddH₂O do objemu 8 µl. Takto připravené vzorky byly zpracovány Laboratoří sekvenace DNA PřF UK. Získané sekvence byly zobrazovány pomocí programu Sequence Scanner v1.0 a alignment byl vytvořen pomocí metody BLAST (online dostupný z <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>).

5.2.4 Příprava, izolace a práce viry

5.2.4.1 Transfekce myších fibroblastů 3T6

Virový genom byl do savčích buněk transfekován pomocí systému Amaxa. Pro transfekci byly použity myší fibroblasty 3T6, které se nacházely v růstové fázi a dosahovaly přibližně 70 - 85 % konfluence. Tohoto stavu bylo docíleno tak, že byly buňky den před transfekcí napasážovány v poměru 1:2. Tyto fibroblasty byly nejprve sklizeny pomocí trypsinu, jak je popsáno v kapitole 5.2.1.1. Počet získaných buněk v mililitru média byl spočítán v Bürkerově komůrce (kapitole 5.2.1.2). Podle počtu transfekčních reakcí byla odebrána buněčná suspenze v takovém množství, aby to odpovídalo 4×10^6 buněk na jednu reakci. Tato suspenze byla centrifugována 10 minut při 4°C 440 g (2000 rpm). Medium bylo odsáto vakuovým systémem a buněčný pelet byl resuspendován v roztoku „Nucleofect Solution“ firmy Lonza (100 µl na reakci). Rovněž byl k suspenzi přidán virový genom. Virový genom byl dodáván v podobě precipitované ligační směsi popsané v kapitole 5.2.3.9 a 5.2.3.6 v objemu 8 µl na každou transfekční reakci. 100 µl takto připravené buněčné suspenze bylo přeneseno do elektroporační kyvety tak, aby nebyly přítomny vzduchové bubliny a roztok byl rovnoměrně rozprostřen po dně kyvety. Následně byly buňky podrobeny výboji v elektroporátoru nastaveného na program T-030. K buňkám bylo okamžitě dodáno 500 µl média RPMI obohaceného o GlutaMAX. Vzniklá suspenze byla přenesena do mikrozkušavky a byla inkubována 15 minut v termostatu při 37°C. Po inkubaci byly transfekované buňky přeneseny do kultivační petriho misky (Ø10 cm) a doplněny sérovým médiem DMEM do objemu přibližně 10 ml. Pro účel kontroly úspěšnosti transfekce pomocí imunofluorescence byly buňky po 20-30 µl aplikovány na sklíčka v 24 jamkové destičce do 1 ml DMEM se sérem. Po 4-5 hodinové inkubaci v termostatu bylo odstraněno médium obsahující mrtvé buňky a nahrazeno čerstvým médiem. Buňky byly ponechány růst po dobu 6-10 dní, během které byly průběžně kontrolovány v optickém mikroskopu.

5.2.4.2 Infekce fibroblastů 3T6 myším polyomavirem

Buňky byly napasážovány den před infekcí. V případě experimentů určených na detekci antigenů pomocí imunofluorescence bylo na každé sklíčko v 24 jamkové destičce naneseno 40 000 buněk. Po 18 - 24 hodinové inkubaci v termostatu bylo z jamek odsáto médium. Buňky byly opláchnuty 0,5 – 1 ml média DMEM bez séra. Následně na ně bylo aplikováno 100 μ l roztoku virového inokula ředěného v bezsérovém DMEM. Množství aplikovaného virového inokula bylo určeno podle infekčního titru zásobního inokula a požadované multiplicity infekce. Při výpočtech byl zohledněn předpoklad, že se počet buněk za 24 hodin zdvojnásobil a v každé jamce je tedy 80 000 buněk. Výpočty byly provedeny následovně:

$$1\text{ ml} \times (\text{MOI} \times 80\,000 / \text{infekční titr na ml}) = \text{objem virového inokula na jamku}$$

Buňky s roztokem obsahující virové inokulum byly inkubovány po dobu 1 hod při 37°C v termostatu. Během inkubace bylo s destičkami každých 15 min kýváno. Po skončení inkubace bylo do jamek doplněno medium se sérem a buňky byly inkubovány v termostatu. Doba infekce byla počítána od začátku inkubace.

Infekce buněk ve velkém objemu sloužící pro namnožení viru probíhala analogicky. Buňky byly pasážovány na Ø10 cm misky a na infekci bylo použito 1 μ l virového inokula (infekční titr: $9,7 \cdot 10^7$) v 1 ml bezsérového media na misku.

5.2.4.3 Reinfekce virovým inokulem

Misky s transfekovanými buňkami (kapitola 5.2.4.1) uskladněné v -80°C byly rozmrazeny při pokojové teplotě a z alespoň dvou náhodně vybraných misek bylo odebráno 700 μ l media. Médium bylo centrifugováno na stolní mikrocentrifuze deset minut při 3000 g. Supernatant byl uschován v mikrozkuvkách v -20°C. Fibroblasty 3T6 byly napasážovány na sklíčka v 24 jamkové destičce v počtu 40 000 buněk na jamku. Po 24 hodinách z nich bylo odsáto medium a buňky byly inkubovány hodinu s 300 μ l virového inokula, které bylo získáno ze supernatantu odebraného z transfekovaných buněk. To bylo následně doplněno 1 ml DMEM se sérem. Buňky byly ponechány v termostatu dalších 23 hodin a následně byly podrobeny imunofluorescenčnímu značení (kapitola 5.2.6.1).

5.2.4.4 Izolace virionů

Infikované nebo transfekované buňky zamrazené v -80°C (kapitola 5.2.4.2 a 5.2.4.1) byly ponechány při pokojové teplotě, dokud nedošlo k rozmrazení veškerého media. Následně byly přeneseny zpět do -80°C, kde byly ponechány alespoň 30 minut. Tento postup byl opakován celkem třikrát. Buňky byly odděleny od povrchu misky mechanicky pomocí škrabátka. Vzniklá

suspenze byla přenesena do sterilní falkony a centrifugována 40 minut při 4°C a 3214 g. Supernatant byl odebrán a uskladněn v -20°C. Buněčný sediment byl resuspendován pomocí skleněného homogenizátoru s 10 mM Tris-HCl pH 7,4 (1ml na suspenzi z Ø10 cm misky). Homogenizátor byl vždy před použitím důkladně očištěn ve vodě a 70% etanolu a několikrát promyt pufrem B. Homogenizace probíhala na ledu s pauzami, tak aby nedocházelo k přehřívání suspenze. K homogenní suspenzi byla přidána neuraminidáza (0,9 µl na suspenzi z jedné 10cm misky, 1-5 U/mg 11,8mg/ml) a apoprotinin (1 µl na suspenzi z jedné Ø10 cm misky, 3-7 TIU/mg 2mg/ml) a byl inkubován na horizontální kývačce při laboratorní teplotě. Po uplynutí přibližně 16 hodin byla suspenze opět centrifugována 40 minut při 4°C a 3214 g, supernatant byl přidán k předchozímu a uschován v -20°C. Pelet byl resuspendován v 10 mM Tris-HCl pH 9 (1 ml na suspenzi z Ø10 cm misky) a inkubován 4 hodiny na horizontální kývačce. Pak byl opět centrifugován za stejných podmínek jako v předchozích případech. Supernatant byl přidán k předchozím dvěma a uskladněn v -20°C. Směs supernatantů byla dále čištěna a koncentrována pomocí centrifugace přes sacharózový polštář (kapitola 5.2.4.5) a izopyknickou centrifugací s následnou dialýzou (kapitola 5.2.4.6 a 5.2.4.8).

Puf B: 10 mM tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,01 mM CaCl₂

5.2.4.5 Centrifugace přes sacharózový polštář

Směs supernatantů odebraných v předchozích krocích (kapitola 5.2.4.4) byla rozdělena do ultracentrifugačních zkumavek a podvrstvena dvěma plnými pasteurovými pipetami 10% roztoku sacharózy v pufru B. Zkumavky byly umístěny do ultracentrifugačních kyvet a k roztokům byl doplněn puf B tak, aby měly stejnou hmotnost. Po vyvážení s přesností na setiny gramu bylo přistoupeno k centrifugaci. Ta probíhala po dobu 3 hodin při 4°C a 25 000 rpm v rotoru SW28 (Beckman). Po slití supernatantu a vysušení zbývající tekutiny byl pelet inkubován 16 hodin na ledu při 4°C s 100 µl pufru B. Po disociaci peletu ze stěny zkumavky byl pelet rozpuštěn v pufru B za pomoci ručního skleněného homogenizátoru. Homogenizace probíhala na ledu s pauzami, tak aby nedocházelo k přehřívání suspenze. Homogenní suspenze byla ponechána na ledu dalších patnáct minut a bylo zkontrolováno, že nedošlo k usazení špatně zhomogenizovaného materiálu.

5.2.4.6 Izopyknická centrifugace v CsCl gradientu

Chlorid cesný (CsCl) byl v ultracentrifugační zkumavce rozpuštěn v roztoku B pufru obsahující virus v hmotnostním poměru 1,2:2,5. V případě, kdy virová suspenze neměla dostatečný objem, byla doplněna přefiltrovaným pufrem B. Po kompletním rozpuštění CsCl byl roztok převrstven bayolem. Ultracentrifugační zkumavky byly vloženy do kyvet a vyváženy pomocí bayolu.

Následovala centrifugace v rotoru SW41 (Beckman) při 35000 rpm a 18°C po dobu 20 – 24 hodin. Po ukončení centrifugace byly ultracentrifugační zkumavky umístěny do aparatury pro rozebírání gradientu, do dna zkumavky byla penetrována dutá jehla a gradient byl pomocí tlaku rozebrán po 20 kapkách (odpovídajících přibližně 0,5 ml) do mikrozkušavek. Tímto způsobem byl gradient obvykle rozebrán na 17 – 25 frakcí.

5.2.4.7 Měření refraktometrického indexu

U všech frakcí získaných po rozebrání gradientu izopyknické centrifugace byl změřen refraktometrický index. Aparatura pro měření refraktometrického indexu byla umístěna ke zdroji přirozeného světla a očištěna vodou a ethanolem. Na hranol byla aplikována kapka o objemu 20 - 30 μ l a po uzavření aparatury byl odečten refraktometrický index.

5.2.4.8 Dialýza

Podle hodnot refraktometrického indexu byly jednotlivé části gradientu z izopyknické centrifugace spojeny do tří frakcí. Frakce 1 (F1) by měla obsahovat zejména volné pentamery a jiné komplexy a nachází se v oblasti gradientu, které odpovídá refraktometrický index 1,3666 a vyšší. Frakci 2 (F2), která by měla majoritně obsahovat plné částice, odpovídá oblast refraktometrického indexu 1,3665 – 1,364. Do frakce 3 (F3), která by měla obsahovat směs prázdných a plných partikulí, byly zařazeny frakce, u kterých byl naměřen refraktometrický index 1,363 a nižší. Rozdělení do takto definovaných frakcí bylo korelováno s výsledky dotblotu (kapitola 5.2.4.9). Dialyzační střeva byla předem povařena 30 minut v roztoku 10 mM EDTA s pH 7,5 – 8. V případě potřeby byla takto předvařená střeva skladována přes noc v 1mM roztoku EDTA ve 4°C. Těsně před použitím byla střeva vařena v destilované vodě 10 min. Do takto připravených střev zbavených těžkých kovů a sloučenin síry byly přeneseny jednotlivé frakce a střeva byla uzavřena svorkami. Dialýza probíhala proti 2 litrům pufru B při 4°C. Po uplynutí tří hodin byl B pufr vyměněn za čerstvý a dialýza probíhala dalších 16 - 72 hodin. Dialyzovaný virový inokulát byl následně koncentrován pomocí centrifugace přes sacharózový polštář, jak je popsáno v kapitole 5.2.4.5 v rotoru SW41 (Beckman) při 35000 rpm, 4°C, 3 hodiny.

5.2.4.9 Dotblot

Na nitrocelulózovou membránu bylo postupně aplikováno 1,5 μ l z každé frakce získané po rozebrání CsCl gradientu (kapitola 5.2.4.6). Membrána byla ponechána schnout několik minut na vzduchu. Po vysušení byla membrána namočená na pět minut do roztoku 0,1%(w/v) Tween-20 v PBS a dále byla imunofluorescenčně značena jak je popsáno v kapitole 5.2.5.11.

5.2.5 Testování virových izolátů

5.2.5.1 Určení hemaglutinačního titru

Hemaglutinace slouží k určení přibližného množství virových částic v roztoku. Zakládá se na schopnosti virionů MPyV vázat kyselinu sialovou na buněčném povrchu a aglutinovat červené krvinky. Jako zdroj červených krvinek byla použita krev z morčete. Tato krev byla opakovaně centrifugována (850 g, 20 min, 4°C) a sediment obsahující krvinky byl promýván v 0,2% (w/v) BSA v PBS. Promývání bylo opakováno, dokud nevznikl čirý supernatant bez zabarvení. Koncentrace krvinek v roztoku 0,2% (w/v) BSA v PBS byla určena jako hematokrit. Do heparinové kapiláry bylo zataveno 30 µl roztoku a po pěti minutách centrifugace (centrifuga MPW 300, rotoru CM 300) byla odečtena výška sloupce obsahující krvinky (v procentech). Krevní roztok byl naředěn tak, aby byl podíl krvinek 0,4 objemových procent. Do mikrotitrační destičky byla po 50 µl aplikována ředící řada virového inokula v roztoku 0,2% (w/v) BSA v PBS. Do každé jamky bylo přidáno 50 µl 0,4% roztoku červených krvinek. Použito bylo 24 ředění v rozsahu $4x - 6,7 \cdot 10^7x$ nebo $40x - 3,3 \cdot 10^8x$. Hemaglutinační test byl vyhodnocen po 3 hodinové inkubaci v laboratorní teplotě nebo po 16 hodinách v 4°C. Po inkubaci zůstávají aglutinované krvinky rovnoměrně rozmístěny na dně jamky, neaglutinované krvinky podléhají sedimentaci a tvoří na dně jamky ohraničený terčík. Nejvyšší ředění, při kterém jsou krvinky aglutinované, odpovídá počtu HAU (haemagglutination units). V případě myšího polyomaviru jedna HAU odpovídá 1×10^7 virových částic.

5.2.5.2 Určení imunofluorescenčního titru

Pro testování infekčního titru izolovaných virových inokul byly použity myší fibroblasty 3T6. Tyto buňky byly ponechány růst přibližně po dobu jednoho dne ve 24 jamkové destičce na vysterilizovaných sklech určených pro imunofluorescenci v množství 40 000 buněk na jamku (kapitola 5.2.1.1). Tyto buňky byly následně infikovány virovým inokulem (100 µl) v ředěních 10^{-2} , 10^{-3} a 10^{-4} (kapitola 5.2.4.2). Experiment probíhal v duplikátech. Dvacet čtyři hodin po infekci byly buňky zafixovány a byl v nich imunofluorescenčně označen LT antigen (kapitola 3.2). Vzorky byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem a byl vybrán vzorek s ředěním, ve kterém byl nejvhodnější poměr LT pozitivních a LT negativních buněk. Ve vybraném vzorku byl spočítán počet jader (DAPI) a počet buněk produkující LT a to v alespoň 25 zorných polích (1500 – 2800 buněk). Ze získaných hodnot bylo vyjádřeno procento buněk produkujících LT. Imunofluorescenční titr byl určen podle následujícího výpočtu:

Průměrný počet LT pozitivních buněk na zorné pole x faktor přepočtu x ředění virového inokula x násobek objemu inokula v 1ml = FFU/ml (množství infekčních virových partikulí v 1ml virového suspenze).

Faktor přepočtu je odvozen z velikosti zorného pole při pozorování daným objektivem. Pro zvětšení objektivu 20x je faktor přepočtu 211 a při zvětšení 40x je 844.

5.2.5.3 Negativní barvení a elektronová mikroskopie

Aktivované měděné elektronmikroskopické sítě byly připraveny Mgr. Martinem Fraiberkem. Síťka byla stranou potaženou filmem položena na 5 ul kapku virového inokula. Vzorky virového inokula, u kterých byla předpokládána vysoká koncentrace partikulí, byly naředěny B pufrem 1:1. Absorbce trvala 8 minut. Následovaly dvě inkubace po dobu 30s na 100μl kapkách destilované přefiltrované vody. Nakonec byl preparát obarven roztokem PTA (2% kyselina fosfowolframová, pH=7,2). Barvení probíhalo dvakrát na 50 μl roztoku po dobu 1 min. Přebytková tekutina byla odsáta pomocí filtračního papíru a preparát byl ponechán doschnout na vzduchu. Vzorky byly pozorovány na transmisním elektronovém mikroskopu Jeol 1011 za asistence RNDr. Miroslava Hyliše, Ph.D.

5.2.5.4 Příprava buněčného lyzátu

Z kultury myších fibroblastů narostlé na Ø10 cm misce bylo odstraněno médium a buňky byly opláchnuty roztokem PBS. K buňkám byl přidán 1 ml PBS. Pomocí škrabátka byly buňky mechanicky odloučeny od povrchu misky. Suspenze byla přenesena do mikrozkuhavky a centrifugována na stolní mikrocentrifuze při 200 g 10 minut. Pelet byl resuspendován ve 100 μl lizačního pufru a následně byl inkubován 20 minut na ledu. Lyzát byl několikrát protažen injekční jehlou (velikost 0,45 x 25 mm, 26G x 1'') Následovala 15 minutová centrifugace při 15871 g (13000 rpm) a 4°C. Supernatant byl uskladněn v -20°C.

Lizační pufr: 10 mM Tris pH7,4, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% (w/v) NP-40, 1% (w/v) deoxycholát sodný, 0,1% (w/v) SDS

Těsně před použitím byly do lizačního pufru přidány inhibitory proteáz, použita byla tableta „cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)“ rozpuštěná v 1,5 ml vody. Na každou buněčnou suspenzi získanou z jedné konfluentně porostlé Ø10 cm misky bylo použito 21,5 μl tohoto roztoku.

5.2.5.5 Určení koncentrace proteinů ve vzorku metodou Bradfordové

Pro určení množství proteinu ve vzorcích virového inokula byla použita metoda Bradfordové. Nejprve byla vytvořena ředící řada BSA rozpuštěného v 0,15 M roztoku NaCl. Použity byly koncentrace 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,6, 0,8 a 1 mg/ml. Do 96 jamkové destičky s plochým dnem bylo v duplikátech přeneseno vždy 10 µl těchto roztoků. Virové inokulum bylo naředěno v roztoku 0,15M NaCl 1:9 a 1:1 a následně byly aplikovány do destičky stejným postupem jako v případě roztoků BSA. Vzorky byly smíchány s 200 µl roztoku Comassie brilliant blue. Po krátké inkubaci byla kolometricky změřena absorbance vzorků při 595 nm. Hodnoty duplikátů ředící řady BSA byly zprůměrovány a byla z nich sestavena regresní přímka. Na základě zjištěné absorbance byla pomocí regresní rovnice odečtena koncentrace proteinů ve vzorcích virového inokula.

5.2.5.6 Určení koncentrace proteinů ve vzorku pomocí přístroje Qubit

Celková koncentrace proteinů ve vzorku byla změřena fluorometricky pomocí přístroje Qubit Thermofisher Scientific. Postupovali jsme podle návodu výrobce.

5.2.5.7 Proteinová elektroforéza SDS – PAGE

Do aparatury pro přípravu elektroforetických gelů byla po důkladném očištění detergentem, vodou a lihem upevněna skla oddělená spacerem. Mezi elektroforetická skla byla aplikována voda a po uplynutí pěti minut bylo zkontrolováno, zda nedošlo k poklesu hladiny a aparatura neprotéká. Po této kontrole správného sestavení aparatury byla voda odstraněna a zbytky tekutiny byly odsáty filtračním papírem. Posléze byl namíchán spodní separační 10% nebo 15% akrylamidový gel s následujícím složením:

4 ml (10% gel) nebo 6,2 ml (15% gel) roztoku 29% akrylamidu a 1% bisakrylamidu

4,5 ml 1M Tris pH=8,8

120 µl 10% SDS

3,25 ml (10% gel) nebo 1ml (15% gel) deionizované vody

40 µl 10% amonium persulfátu

8,5 µl TEMED

Nikdy nebyl použit roztok 10% amonium persulfátu, který byl starší více než 3 týdny. Při přípravě gelu byly roztoky amonium persulfátu a TEMED přidány jako poslední, vše bylo důkladně promícháno a neprodleně přeneseno mezi elektroforetická skla. Gel byl převrstven

přibližně 1-2 ml vody a byl ponechán polymerizovat 30 minut. Voda byla odstraněna a vysušena a nad ztuhlý rozdělovací gel byl přenesen vrchní zaostřovací 5% akrylamidový gel:

0,5 ml roztoku 29% akrylamidu a 1% bisakrylamidu

375 μ l 1M Tris pH 6,8

30 μ l 10% SDS

2,11 ml deionizované vody

20 μ l 10% amonium persulfátu

5 μ l TEMED

Do aparatury byly zasunuty hřebínky pro tvorbu jamek a vše bylo upevněno svorkami. Po 20 minutách byla aparatura rozebrána a elektroforetická skla s gelem přenesena do aparatury pro elektroforézu. Aparatura byla naplněna elektroforetickým pufrem do výše vyznačené výrobcem. Vzorky byly smíchány s 5x koncentrovaným Laemmliho vzorkovým pufrem v poměru 4:1 a povařeny 5 minut. Jamky vzniklé po vytažení hřebínku byly propláchnuty elektroforetickým pufrem a bylo do nich nanášeno 10 - 15 μ l vzorku a 5 μ l proteinového markeru molekulových vah (Black Protein Ladder). Aparatura byla zapojena ke zdroji a elektroforéza probíhala nejprve 20 minut při 8 V/cm a vzápětí 1,5 – 2 hodiny při 14 V/cm.

Elektroforetický pufr: 25 mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS pH 8,3,

Nanášecí Laemmliho vzorkový pufr: 50% (v/v) glycerol, 25% (v/v) 2-merkaptoethanol, 50mM tris-HCl pH 6.8, 5% (w/v) SDS, 0.002% bromfenolová modř

5.2.5.8 Proteinová elektroforéza s použitím gradientového gelu

Pro proteinovou elektroforézu v gradientovém gelu byl použit NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gel firmy Thermofisher scientific. Gel byl omyt v destilované vodě, upevněn do aparatury a zalit elektroforetickým NuPAGE® MOPS SDS Running pufrem. Vzorky byly smíchány s doporučeným množstvím vzorkového pufru Nu-PAGE ® LDS 4x a NuPAGE reducing agent 10x, povařeny a nanášeny na gel stejným způsobem, jako bylo popsáno v kapitole 5.2.5.7.

5.2.5.9 Fixace a barvení gelu po SDS -PAGE

Gel byl zafixován inkubací v 50 ml roztoku 50% metanolu a 7% kyseliny octové. Inkubace byla opakována dvakrát po dobu 30 minut na horizontální třepačce. Gel byl barven v 60 ml roztoku

SYPRO® Ruby Protein Gel Stain po dobu minimálně 12 hodin na třepačce a s omezeným přístupem světla. Po zakončení inkubace byl gel na 30 minut ponořen do 50 ml roztoku 10% metanolu a 7% kyseliny octové. Před pořízením snímků na přístroji Amersham imager 600 byl gel omyt v destilované vodě.

Alternativně byl gel fixován 1 hodinu v roztoku 45% methanol a 10% kyseliny octové. Následně byl gel třikrát omyt v deionizované vodě po dobu 5 minut. Gel byl barven 2 hodiny v 20 ml GelCode Blue Stain Reagent. Dále byl odbarven ve vodě při 4°C po dobu alespoň 12 hodin.

5.2.5.10 Western blot

Gely byly vyndány z aparatury pro elektroforézu, sejmuty z elektroforetických skel, odděleny od horního zaostřovacího gelu a přeneseny do blotovacího pufru. V blotovacím pufru byly ponechány 10 minut. Nitroceluózová membrána byla ustřižena do požadované velikosti (obvykle 8 cm x 8,5 cm s ustříhlým jedním rohem pro usnadnění orientace) a na 5 minut ponořena do blotovacího pufru. Postupně byl sestaven blotovací sendvič ze savé houby (která je součástí aparatury), jedné vrstvy silnějšího papíru (Whartman), čtyř vrstev filtračního papíru o velikosti odpovídající membráně, nitroceluózové membrány, gelu, čtyř vrstev filtračního papíru, jedné vrstvy Whartmenu a savé houby. Každá složka byla vždy nejprve řádně namočená v blotovacím pufru a z vrstev papíru byly tlakem odstraněny bubliny. Celý stoh byl uzavřen mezi blotovací mřížky a přenesen do aparatury naplněné blotovacím pufrem v takové orientaci, aby se membrána nacházela mezi gelem a kladnou elektrodou. Aparatura byla umístěna do nádrže s ledem a zapojena ke zdroji. Transfer probíhal při 100V a 250mA 1,5 hodiny (VP1) nebo 3 hodiny (VP2/3).

Blotovací pufr: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) metanol

5.2.5.11 Detekce proteinů imobilizovaných na membráně

Membrána vyndaná z blotovací aparatury, nebo membrána s nanesenými vzorky z dotblotu byla krátce namočená v roztoku 0,1% Tween-20 v PBS. Následovala blokáce v roztoku 5% mléka a 0,1% Tween-20 v PBS po dobu 30 min. Membrána byla omyta v 0,1% Tween-20 v PBS. Značení membrány primární protilátkou naředěné v roztoku 5% mléka a 0,1% Tween-20 v PBS probíhalo v kompletně zatavené fólii po dobu 1 hod při pokojové teplotě nebo přes noc při 4°C. Membrána byla omyta 3x 10 min (dotblot) nebo 5x 5 min (western blot) v 0,1% Tween-20 v PBS na vertikální kývačce. Následovala inkubace po dobu 30 min se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou ředěnou v 5% roztoku mléka a 0,1% Tween-

20. Inkubace opět probíhala v zatavené fólii, ze které byla membrána následně vyjmuta a 3x nebo 5x promyta 0,1% Tween-20 v PBS. Pro vizualizaci signálu byly smíchány předpřipravené roztoky A a B a membrána v nich byla inkubována 30 – 60 vteřin. Vzniklý signál byl zaznamenán kolometricky na přístroji Amersham imager 600.

Vyvolávací roztok A: 20 ml 100mM Tris-HCl pH 8,3, 200 μ l 0,5% (w/v) luminolu v DMSO
88 μ l 1,5% (w/v) kyseliny p-kumarové v DMSO

Vyvolávací roztok B: 20 ml 100mM Tris-HCl pH 8,3, 20 μ l 30% H₂O₂

5.2.5.12 Izolace genomové DNA z virionů

Virové inokulum bylo naředěno v B pufru 1:4. K 50 μ l tohoto roztoku bylo přidáno 0,5 μ l 1M MgCl₂ a 1 μ l DNazy I (10mg/ml). Reakce probíhala v 37°C po dobu jedné hodiny. Účelem tohoto kroku je degradace DNA nacházející se v roztoku vně virových partikulí. Reakce byla zastavena přidáním 1 μ l 0,5M roztoku EDTA a následně byla DNaza inaktivována 5-10 min při 75-80°C. K roztoku bylo přidáno 50 μ l 20mM Tris-HCl pH 8 a 2,5 μ l proteinazy K (20 mg/ml). Reakce probíhala 1 hod při 60°C. Následovala inkubace 30 min při 60°C s 5 μ l 0,5M DTT. Roztok byl doplněn do 500 μ l destilovanou filtrovanou vodou a v digestoři k němu bylo přidáno 500 μ l roztoku fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu (v poměru 25:24:1). Po důkladné homogenizaci pomocí vortexu po dobu minimálně 20 s byl roztok 5 min centrifugován při 13400 rpm (stolní minicentrifuga). Vrchní vodní fáze byla odebrána a DNA v ní byla vysrážena analogickým způsobem, jako je popsáno v kapitole 5.2.3.9. Precipitovaná DNA byla peletována centrifugací při 16000 g a 4°C po dobu 30 min, převrstvena 70% ethanolem a centrifugována za stejných podmínek dalších 10 min. Pelet byl po vysušení na vzduchu rozpuštěn v 15 μ l vody. Vyizolovaná virová DNA byla použita pro určení genových ekvivalentů (kapitola 5.2.5.13) nebo pro ověření nukleotidové sekvence (kapitola 5.2.3.10).

5.2.5.13 Určení genomových ekvivalentů pomocí metody real time PCR

Množství genomových ekvivalentů bylo určováno prostřednictvím real time PCR, kde jako templát byla použita DNA získaná izolací z virových partikulí (kapitola 5.2.5.12). DNA byla použita v ředěních 1, 1/10 nebo 1/50. Pro stanovení standardní křivky byla připravena ředící řada plasmidu pMJG ve vodě v rozsahu 1 ng/ μ l – 1x10⁶ ng/ μ l nebo 0,1 ng/ μ l - 1x10⁶ ng/ μ l. Reakce probíhaly v objemu 10 μ l. Do mikrodestičky (bioplastics) byl aplikován 1 μ l roztoku DNA spolu s 9 μ l reakční směsi obsahující 5 μ l iQTM SYBR® Green Supermix, 2 pmol vybraných primerů a přefiltrovanou destilovanou vodu. Testování probíhalo v triplikátech. Destička byla překryta fólií a centrifugována 2 minuty při 1620 g a 22°C v centrifuze 54304

epENDORF s rotorem 5430/5430R. Reakce probíhala v přístroji Light Cycler 480II s následujícími parametry:

	teplota	čas	ramp	opakování
Iniciace	95°C	5 minut		
Dvojkrokový cyklus	95°C	10 s	4,8	40x
	60°C	30 s	2,5	
Analýza tání	97°C	10 s	4,8	
	65°C	1 minuta	2,5	
	97°C	...	0,11	
Závěr	40°C	10 minut	2,5	

V některých případech byl místo iQTM SYBR® Green Supermix použit roztok ABSolute QPCR SYBER green Mix. V takových případech byly podmínky reakcí následující:

	teplota	čas	ramp	opakování
Iniciace	95°C	15 minut		
tříkrokový cyklus	95°C	15 s	4,8	40x
	58°C	30 s	2,5	
	72	30 s	4,8	
Analýza tání	95°C	5 s	4,8	
	65°C	1 minuta	2,5	
	97°C	...	0,11	
Závěr	40°C	10 s	2,5	

Veškerý další postup byl totožný s předchozím.

Fluorescence byla odečítána v rozmezí 465-510 nm. Získaná data byla analyzována programem Light Cycler R 480. Naměřené hodnoty Cp umožnily porovnat množství virové DNA ve virových inokulech a odečtem ze standartní křivky bylo možné určit její přibližnou koncentraci a počet genových ekvivalentů.

5.2.6 Další metody

5.2.6.1 Fixace buněk a nepřímá imunofluorescence

Buněčná kultura narostlá na mikroskopickém sklíčku (kapitola 5.2.1.1) byla opláchnuta roztokem PBS určeném pro tkáňové kultury. Buňky byly zafixovány roztokem 3%

paraformaldehydu. Fixace probíhala 15 - 30 minut. V některých případech byly buňky po fixaci třikrát omyty PBS (vždy 10 minut) a uskladněny ve 4°C přes noc. Následovala permeabilizace membrán po dobu 5 min v 0,5% roztoku Triton X-100 v PBS. Buňky byly 3x omyty PBS. Blokace byla provedena v roztoku 0,25% želatiny a 0,25% BSA v PBS, použito bylo 500 µl tohoto blokačního roztoku a inkubace trvala 30 nebo 60 minut. Vybrané antigeny byly označeny primárními protilátkami ředěnými v blokačním roztoku. Použito bylo 200 µl roztoku s protilátkami na sklíčko a značení probíhalo po dobu 60 minut. Následovala promývání roztokem PBS (3x 10 min). Dále byly buňky inkubovány 30 min s roztokem sekundárních protilátek ředěných v blokačním roztoku a opět byly omyty 3x 10 min v roztoku PBS. Od aplikace sekundárních protilátek probíhal experiment v podmínkách s omezeným přístupem světla. Sklíčka byla vyjmuta z 24 jamkové destičky a opakovaně ponořena do destilované vody. Přebytečná voda byla odsáta filtračním papírem a sklíčka byla ponechána doschnout na vzduchu (15 – 30 minut). Stranou porostlou buňkami byla sklíčka montována na podložní skla do 2,5 µl 70% roztoku glycerolu s DAPI. Vzorky byly pozorovány pod fluorescenčním (Olympus IX71) nebo konfokálním mikroskopem (Carl Zeiss LSM 880 NLO a Leica TCS SP2).

5.2.6.2 Konfokální mikroskopie a zpracování obrazu pomocí ImageJ

Snímky imunofluorescenčně značených buněk uvedené v této práci byly pořízeny fluorescenčním mikroskopem Olympus IX71 nebo konfokálními fluorescenčními mikroskopy Carl Zeiss LSM 880 NLO a Leica TCS SP2. Analýza obrazu byla provedena v programu Fiji Is Just ImageJ.

Pro analýzu klastrů s kolokalizací červeného a zeleného signálu bylo použito makro Dana Shiwarski, Rubena K. Dagda, Ph.D. a Charleena T. Chu, M.D., Ph.D. „Green and Red Puncta Colocalization“, volně dostupné z:

http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:analysis:colocalization_analysis_macro_for_red_and_green_puncta:start

V případě experimentů, u kterých bylo určováno množství LT pozitivních buněk, byly buňky počítány buď přímo pozorováním v mikroskopu za pomoci ručního počítadla, nebo analýzou vyfotografovaného obrazu v ImageJ. Za tímto účelem bylo vytvořeno makro „DAPI a LT s opakováním“. Výsledek programu byl vždy opticky kontrolován.

Intenzita proužků na membráně získaných metodou western blot, byla po převedení do osmi bitového obrázku analyzována funkcí Image J: *Analyze>Gels>Plot Lanes* a *Analyze>Gels>Label Peaks*.

Analýza kolokalizace a vytvoření pixelové mapy kolokalizací byla provedená pomocí funkce *colocalization threshold* programu Image J

5.2.6.3 Proximity ligation assay

„Proximity ligation assay“ (PLA) byla provedena s použitím komerční sestavy Duolink kit (Sigma-Aldrich). Buňky narostlé na mikroskopickém sklíčku byly fixovány a označeny primárními protilátkami stejným způsobem jako je popsáno v kapitole 5.2.6.1. Další postup byl proveden podle doporučení výrobců s tím rozdílem, že promývání probíhalo pouze v objemu 5 ml. Pro značení primárních protilátek jsme použili próby anti-králíčí plus (DUO92002) a anti-myší minus (DUO92004). Po označení vzorků primárními protilátkami a próbami následovala ligační reakce a *in situ* amplifikační PCR reakce. Amplifikované DNA byla označena hybridizací s fluorescenčně značenými oligonukleotidy (kex = 594 nm and kem = 624 nm). Takto značené buňky jsme pozorovali na fluorescenčním mikroskopu.

6 Výsledky

6.1 Myší polyomavirus a jeho interakce s vybranými proteiny endoplasmatického retikula během časně fáze infekce

Polyomaviry při své cestě do jádra procházejí endoplasmatickým retikulem. Aby mohly infikovat buňku musí opustit tento kompartment a být uvolněny do cytosolu. Na tomto procesu se podílí řada hostitelských proteinů, které se shlukují do virem indukovaných „foci“. V této části práce jsme se zaměřili na studium myšího polyomaviru (MPyV), jeho interakci s vybranými hostitelskými proteiny a schopnosti indukovat shlukování kochaperonu DNAJ B14.

6.1.1 Produkce a izolace myšího polyomaviru

Pro studium interakcí MPyV s vybranými hostitelskými proteiny v časně fázi infekce, bylo třeba nejprve připravit virus v dostatečném množství a požadované čistotě. Pomnožení viru probíhalo v kultuře myších fibroblastů 3T6 narostlých na 11 miskách o průměru 10 cm. Pro infekci bylo použito inokulum MPyV, s datem přípravy 4. 11. 2013, třetí frakce, s imunofluorescenčním titrem $9,7 \times 10^7$ a hemaglutinačním titrem $8,10^{11}$.

Průběh infekce jsme průběžně opticky sledovali. Sedmý den bylo možné pozorovat výrazný cytopatický efekt ve všech miskách s infikovanou kulturou. Vzhled kultury se výrazně lišil od kontrolní neinfikované kultury. Infekci jsme zastavili uložením misek s buňkami i médiem při -80°C . Izolace jsme provedli způsobem, jak je popsáno v kapitolách (5.2.4.4-5.2.4.8). Virový extrakt jsme přečistili centrifugací přes 10% sacharózový polštář. Poté jsme provedli izopyknickou centrifugaci v gradientu CsCl. Vzhledem k velkému objemu vstupního materiálu jsme virus centrifugovali ve třech gradientech. Ty jsme rozebrali do frakcí a u každé jsme změřili refraktometrický index. Podle hodnot refraktometrického indexu jsme vzorky pospojovali do tří společných frakcí. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 1. Virové frakce jsme dialyzovali proti B pufru (kapitola 5.2.4.8), dále jsme je koncentrovali přes sacharózový polštář a rozpustili v pufru B. Koncentrace virových částic v inokulech jsme testovali hemaglutinačním testem a v případě frakce 2 a 3 jsme rovněž určili infekční titr (kapitoly 5.2.5.1 a 5.2.5.2). Infekční titr je vypočítán z počtu buněk v infikované kultuře, které produkují velký T antigen (LT). Detekce LT metodou nepřímé imunofluorescence slouží k nepřímému rozpoznání infikovaných buněk. Infekční titr přibližně odpovídá koncentraci infekčních částic v mililitru inokula. Výsledky jsou uvedeny v Tabulka 2. V tabulce je rovněž uvedeno procento buněk pozitivních na LT 24 hodin po infekci při ředění inokula 1000x (0,1 μl inokula na jamku o průměru 1,5 cm).

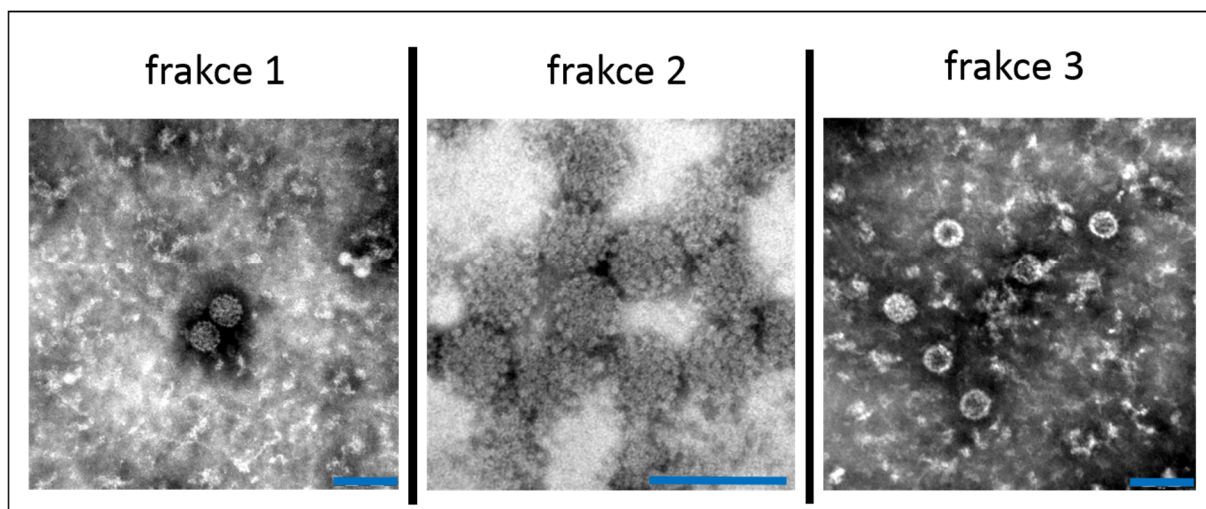
	gradient A-(η)	gradient B-(η)	gradient C-(η)
F1	1,358	1,359	1,374
	1,378	1,378	1,374
	1,377	1,361	1,372
	1,375	1,375	1,370
	1,373	1,372	1,368
	1,371	1,370	
	1,369	1,369	
	1,368	1,368	
F2	1,367	1,367	1,367
	1,366	1,366	1,366
	1,365	1,365	1,3655
	1,364	1,365	1,365
	1,3639	1,364	1,3646
	1,3639	1,364	1,364
	1,363	1,3635	1,3639
		1,363	1,3631
F3	1,3628	1,362	1,3629
	1,362	1,361	1,362
	1,361	1,360	1,361
	1,360	1,359	1,360
	1,359		1,359

Tabulka 1 – **Refraktometrické indexy a rozdělení do frakcí.** Gradienty chloridu cesného byly rozebrány do frakcí o objemu přibližně 0,5 ml. U jednotlivých vzorků byl změřen refraktometrický index(η) uvedený v tabulce. V tabulce je rovněž graficky znázorněno jejich následné rozřazení do frakce 1 (F1), frakce 2 (F2) a frakce 3 (F3).

	hemaglutinační titr	infekční titr (FFU/ml)	LT pozitivní myší fibroblasty 3T6 při ředění 10^3
F1	$5,1 \times 10^{10}$		
F2	4×10^{11}	$1,632 \times 10^8$	32,90%
F3	4×10^{11}	$5,232 \times 10^7$	10,43%

Tabulka 2 – **Charakterizace virového inokula.** Frakce 1, 2 a 3 byly testovány metodou hemaglutinace, zjištěný titr je uveden v prvním sloupci. Frakcemi 2 a 3 v různém ředění byly infikovány myší fibroblasty 3T6, které byly po 24 hodinách zafixovány a imunofluorescenčně označeny protilátkami proti LT antigenu, buněčná jádra byla označena pomocí DAPI.

Viriony v jednotlivých frakcích jsme analyzovali elektronovou mikroskopií, metodou negativního barvení (kapitola 5.2.5.3, Obrázek 11). První frakce obsahovala volné pentamery, nečistoty a v omezeném množství virové částice. Druhá frakce obsahovala zejména koncentrované plné virové částice. Třetí frakce sestávala ze směsi plných a prázdných virových částic a také obsahovala menší množství nečistot. Pro následující experimenty byla použita výhradně druhá frakce.



Obrázek 11: Snímky izolátů myšího polyomaviru z elektronového mikroskopu. Vzorky jednotlivých izolovaných frakcí byly adherovány na mikroskopické sítě. Kontrast byl zajištěn metodou negativního barvení (PTA). Modrá úsečka odpovídá 100 nm.

6.1.2 Změna lokalizace DNAJ B14 a kolokalizace s VP1 v časně fázi infekce myším polyomavirem

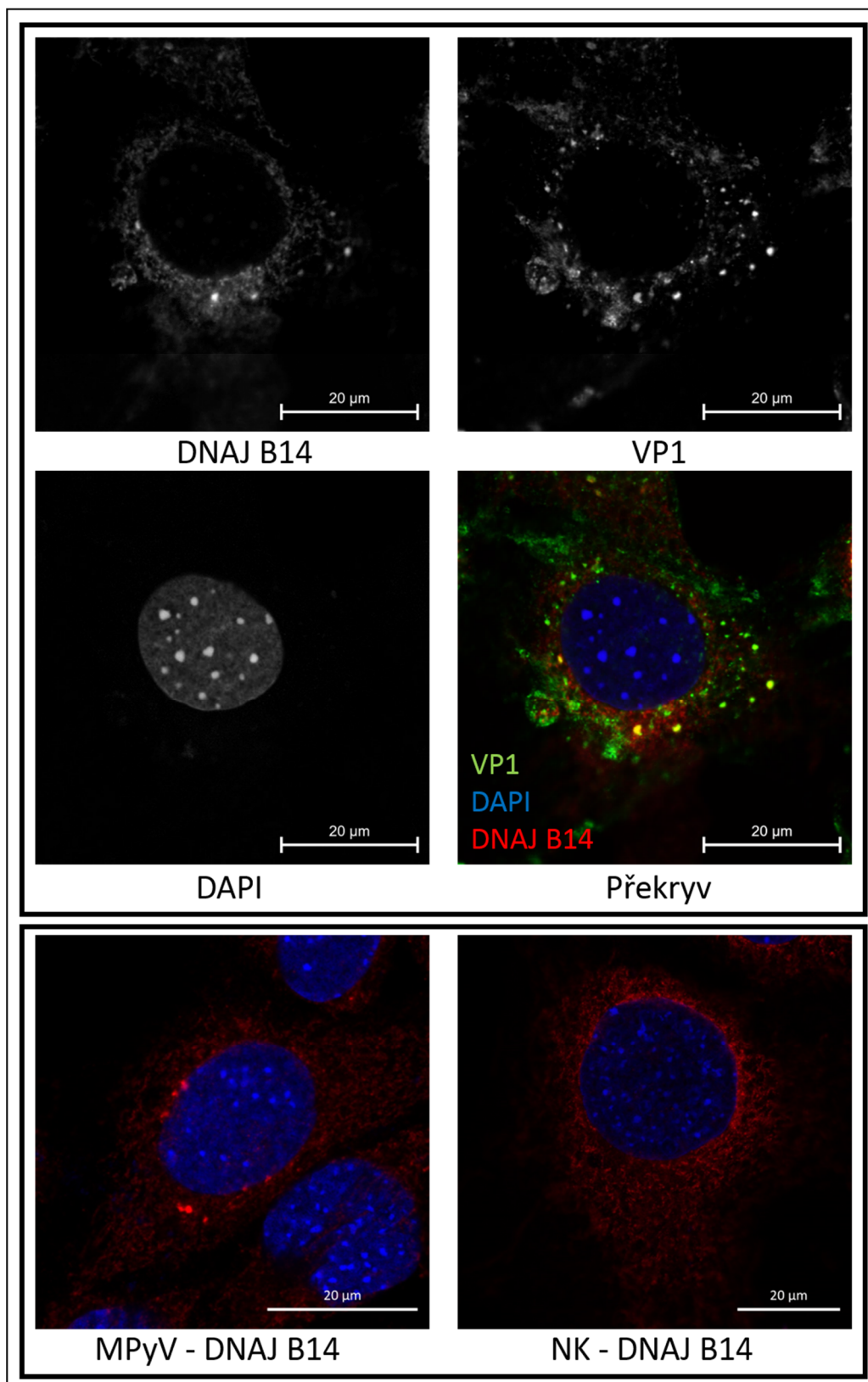
DNAJ B14 je jedním z transmembránových proteinů ER, u něhož byla pozorována změna lokalizace při infekci SV40 (kapitola 3.3.2.3). Zajímalo nás, zda k tomuto jevu dochází i během infekce myším polyomavirem a zdali DNAJ B14 bude kolokalizovat s MPyV viriony. Pro sledování lokalizace DNAJ B14 v časně fázi infekce MPyV jsme zvolili značení proteinů v buňkách metodou imunofluorescence. Myší fibroblasty 3T6 (6.pasáž) jsme infikovali virovým inokulem MPyV F2 (kapitola 5.2.4.2) s multiplicitou infekce 5, Kontrolní buňky (negativní kontrola) jsme ponechali neinfikované. Sedm hodin po infekci jsme buňky fixovali a provedli imunofluorescenční značení virového hlavního kapsidového proteinu VP1 a buněčného proteinu DNAJ B14 (kapitola 5.2.6.1). Konfokální mikroskopií jsme sledovali lokalizaci značených proteinů (Obrázek 12 a Obrázek 13). Infikované buňky byly označeny buď kombinací protilátek proti VP1 a DNAJ B14 (Obrázek 12A a Obrázek 13) nebo pouze protilátkou proti DNAJ B14 (Obrázek 12B). Na snímcích reprezentativních řezů jsou viditelná

místa kolokalizace červeného (DNAJ B14) a zeleného (VP1) signálu (Obrázek 12A a Obrázek 13A). Tyto oblasti jsou poměrně velké a je možné je pozorovat i při nízkém zvětšení (400x) na běžném fluorescenčním mikroskopu. Infikované buňky, ve kterých byl označen pouze hostitelský protein DNAJ B14 (Obrázek 12B vlevo) a neinfikované buňky (Obrázek 12B pravo) slouží jako kontroly.

Neinfikované buňky vykazují fenotyp s rovnoměrným výskytem DNAJ B14 v cytoplasmě s mírně vláknitým vzorem, který odpovídá ER membránové lokalizaci DNAJ B14 (Obrázek 12B vpravo). V případě infikovaných buněk jsme detekovali tento protein ve zvýšené míře v místech kolokalizace s VP1, kde tvoří distinktní body, v literatuře nazývané jako „foci“. Tuto změnu lokalizace DNAJ B14 jsme pozorovali i v infikovaných buňkách, které jsme označili pouze protilátkou proti DNAJ B14 a nikoli protilátkou proti VP1 (Obrázek 12B, vlevo). Zmíněná „foci“ tedy nejsou artefaktem způsobeným neočekávanou interakcí protilátek nebo detekcí signálu z Alexa Fluor 488 v detekčním spektru pro Alexu Fluor 546.

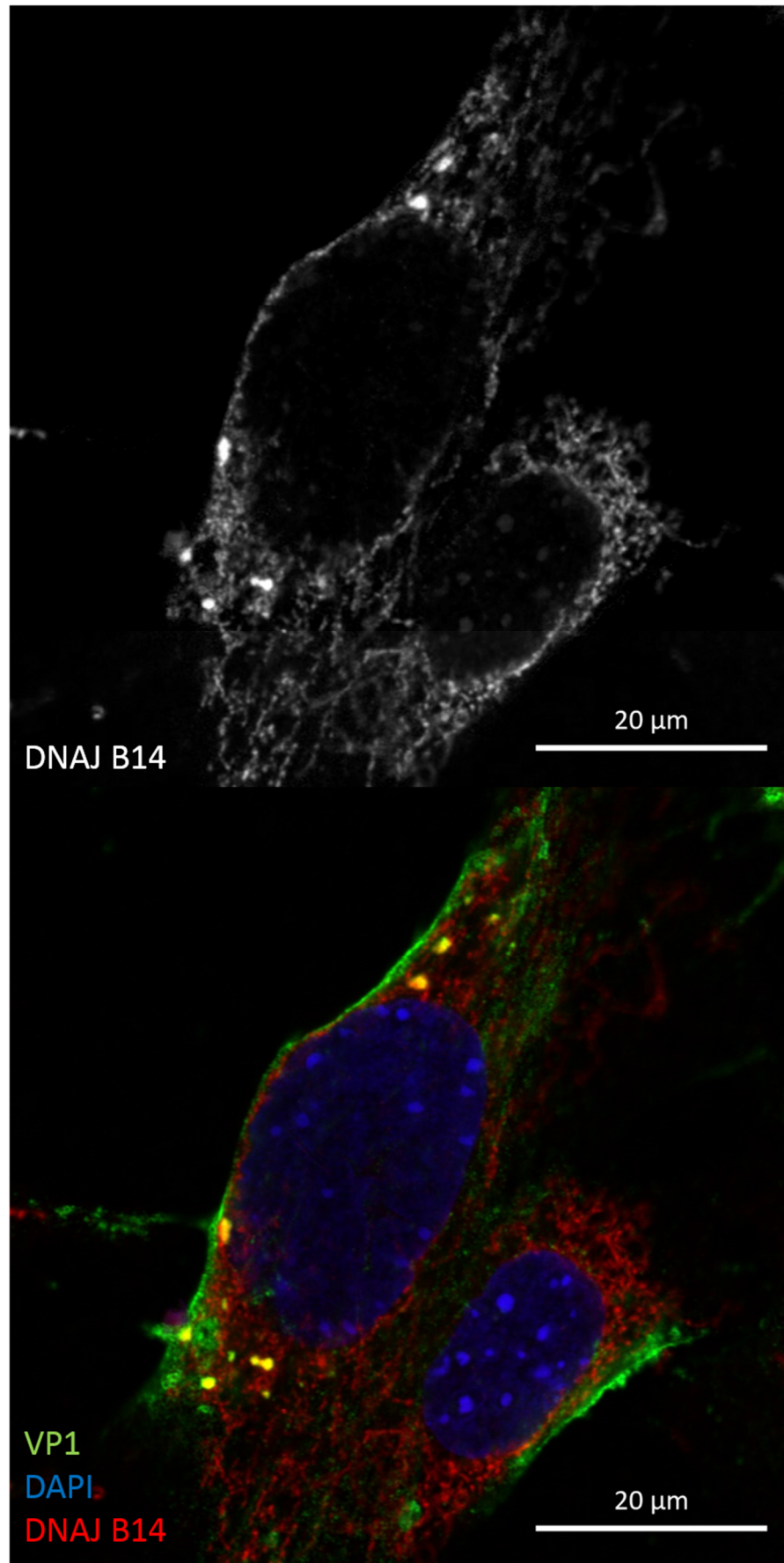
V infikovaných buňkách jsme pozorovali různorodost kolokalizace VP1 s DNAJ B14 (Obrázek 13B). Obvykle bylo v buňce více kolokalizujících „foci“ a jejich velikost a tvar byly variabilní. Přítomny byly i infikované buňky, ve kterých se tyto shluky nevyskytovaly.

Kromě kolokalizací VP1 s DNAJ B14 jsme rovněž testovali kolokalizaci s hostitelským proteinem BAP31. BAP31 je jeden z proteinů nutných pro úspěšnou infekci MPyV a SV40 (Geiger et al., 2011). Sledovali jsme kolokalizace BAP31 a VP1 v časech 3, 5 a 7 hpi. Bohužel, použití komerční protilátka proti BAP31 byla málo specifická a proto výsledky neprezentujeme, dokud je nepotvrdíme jiným způsobem.

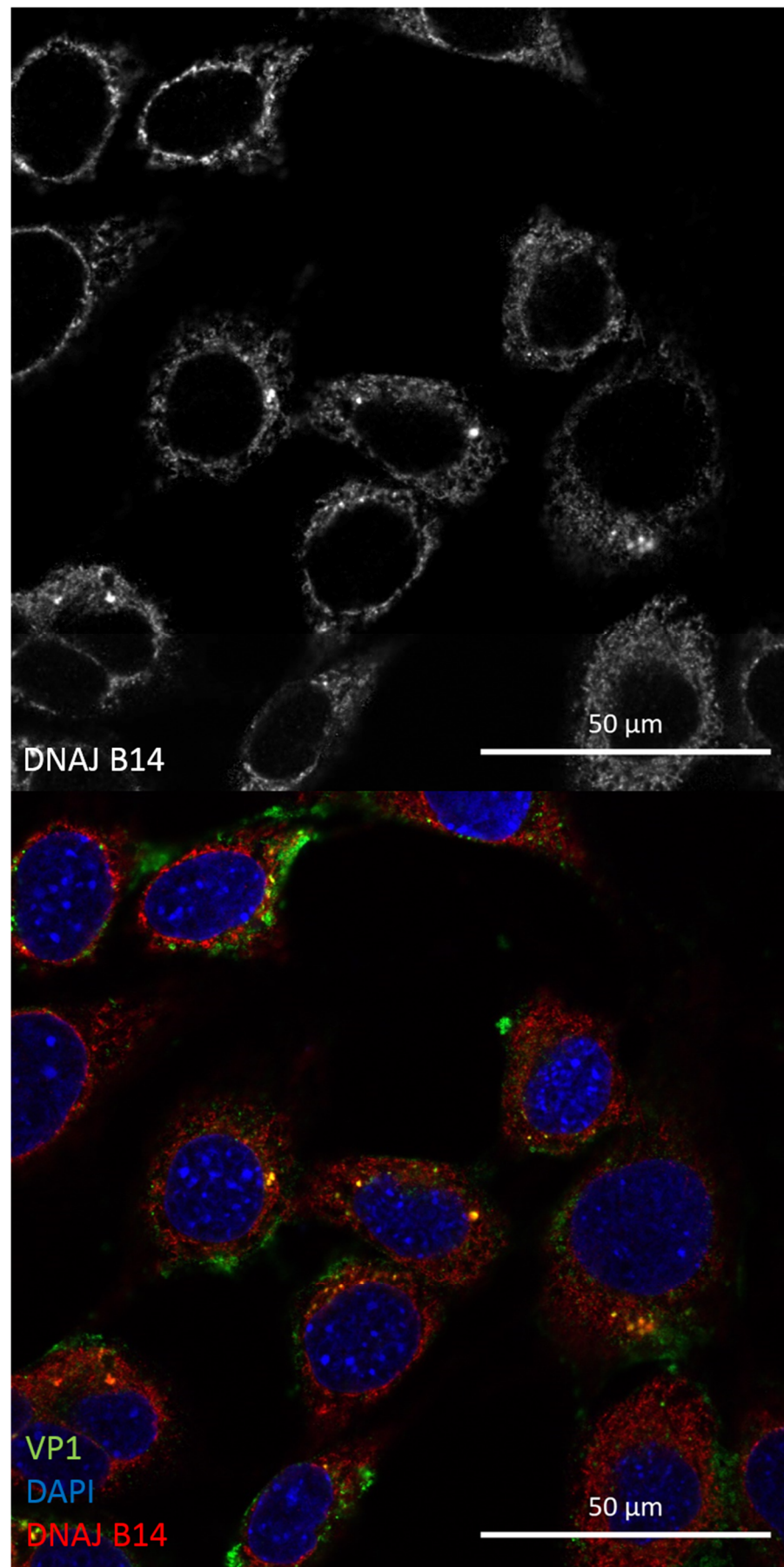
A

Obrázek 12: **Lokalizace VP1 a DNAJ B14 7 hpi MPyV:** Myší fibroblasty 3T6 byly infikovány MPyV F2 s multiplicitou infekce 5, fixovány 7hpi a imuno fluorescenčně označeny proteiny DNAJ B14 (červeně) a VP1 (zeleně). Jádra jsou značena DAPI (modře). **A:** Jednotlivé barevné kanály jsou prezentovány v bílé, překryv barevně. **B:** Buňky byly buď infikovány (vlevo) nebo neinfikovány (vpravo) a označeny protilátkou proti DNAJ B14. Snímky byly pořízeny konfokálním mikroskopem Carl Zeiss LSM 880 NLO. Prezentovány jsou reprezentativní řezy buňkou.

A



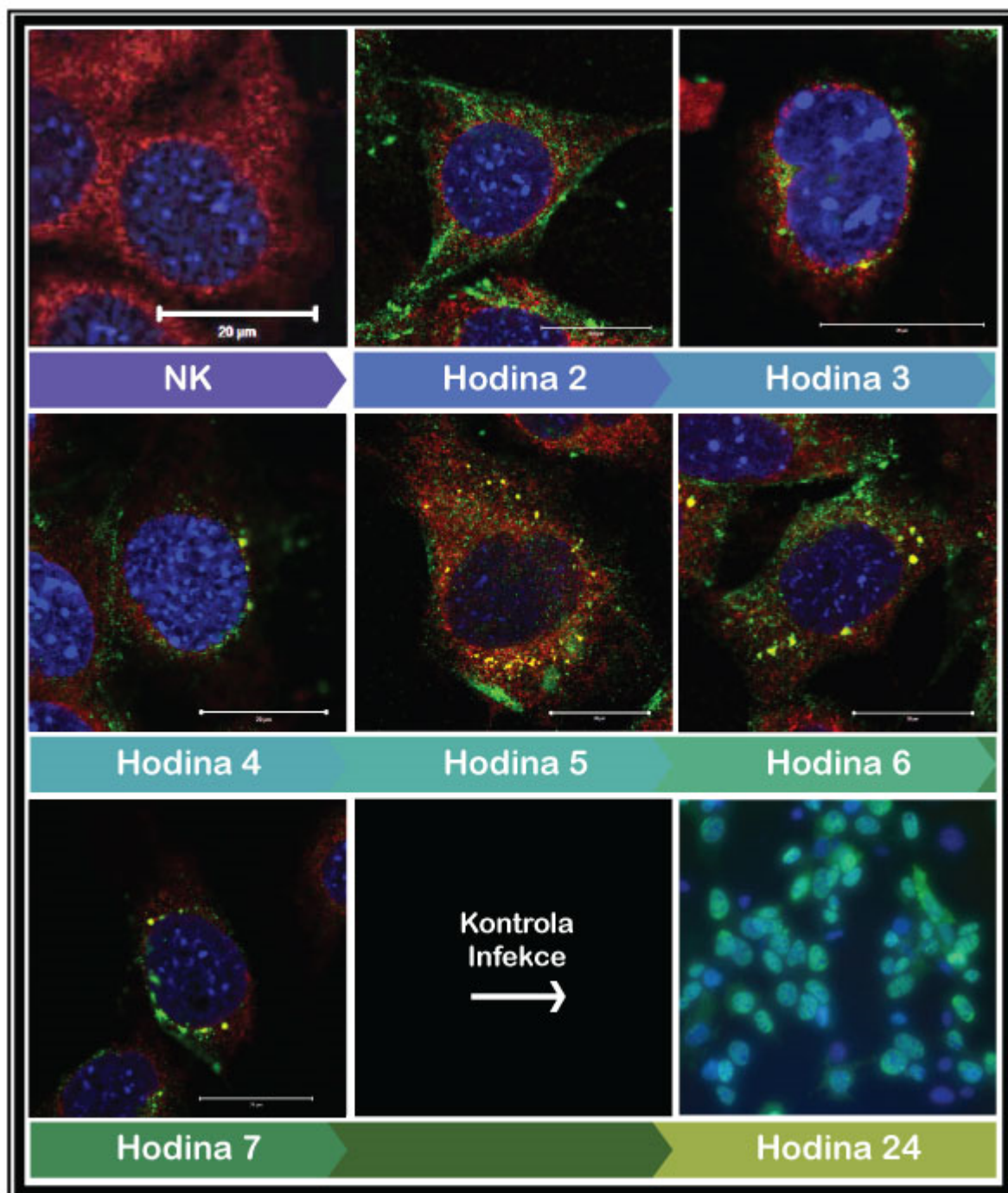
B



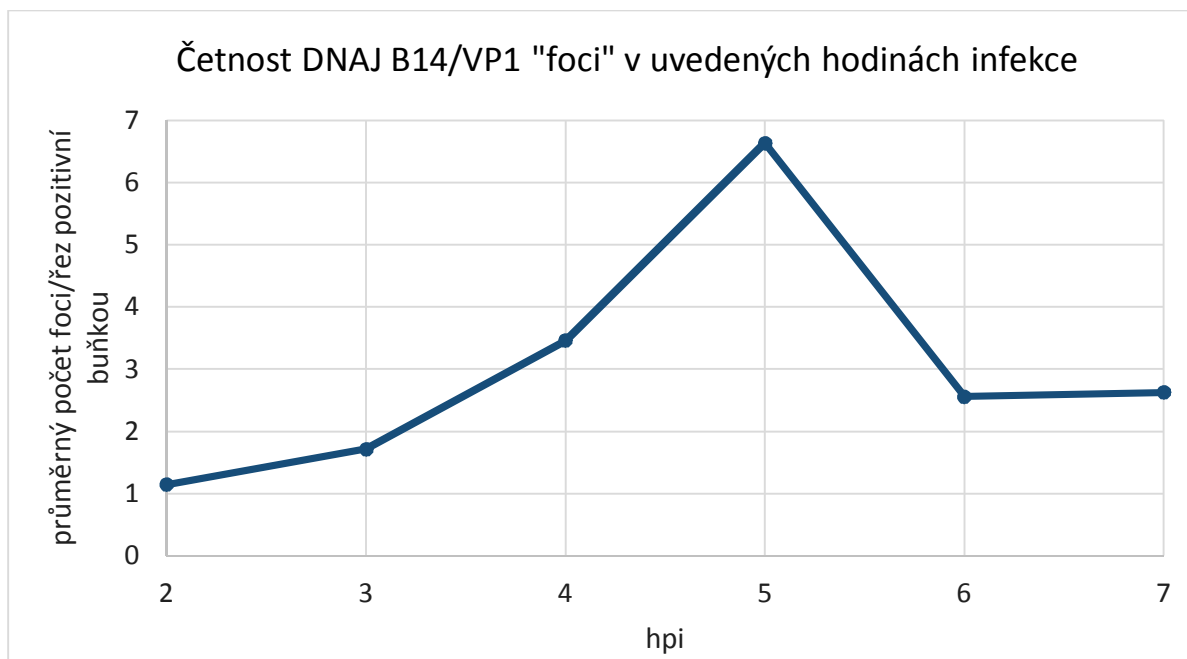
Obrázek 13: **Vybrané příklady lokalizace VP1 a DNAJ B14 7 hpi.** Myší fibroblasty 3T6 byly infikovány divokým kmenem myšího polyomaviru (F2) s multiplicitou infekce 5. Sedm hodin po infekci byly fixovány a imunofluorescenčně označeny proteiny DNAJ B14 (červeně) a VP1 (zeleně). Jádra jsou značena DAPI (modře). Prezentován je červený kanál pro DNAJB14 v bílé (horní panely) a překryv všech barevných kanálů (dolní panely). A: řez buňkami při větším zvětšení– B: řez buňkami – širší pohled. Snímky byly pořízeny konfokálním mikroskopem Carl Zeiss LSM 880 NLO.

6.1.3 Výskyt shluků DNAJ B14 a VP1 během časně fáze infekce

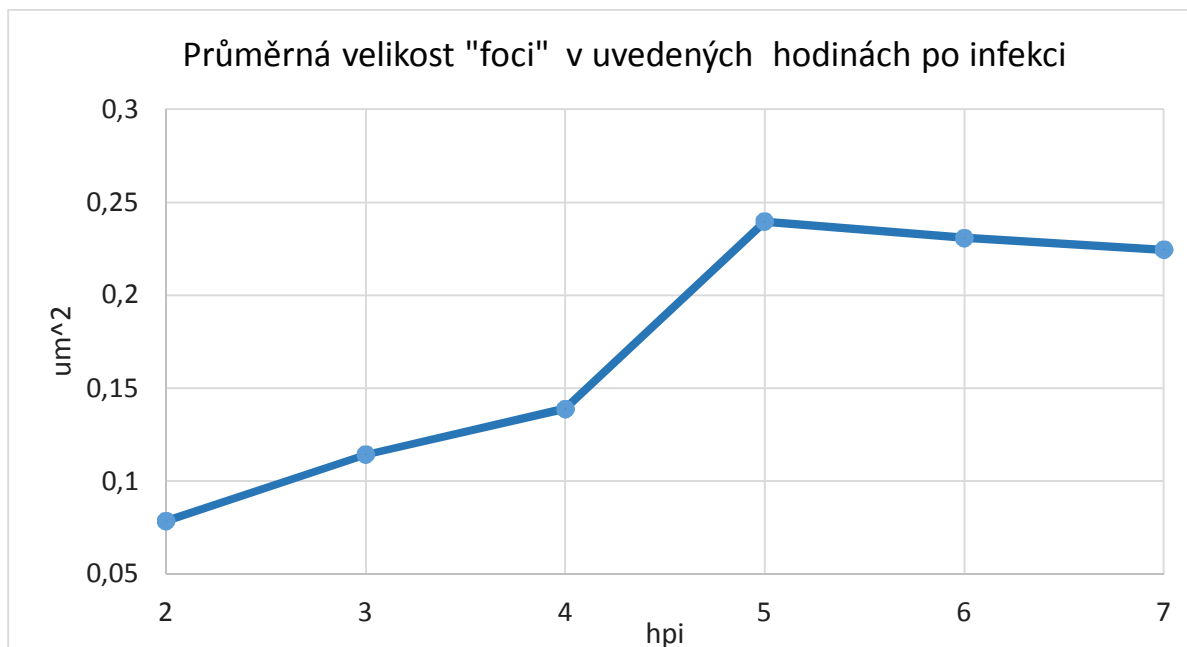
Dále nás zajímalo, v jakém čase po začátku infekce se tvoří DNAJB14/VP1 „foci“ a jak se mění jejich výskyt a velikost v čase. Buňky 3T6 (13. pasáž) narostlé v 24 jamkových destičkách na sklíčkách pro mikroskopii jsme infikovali MPyV (F2) s multiplicitou infekce 5. Dvě hodiny po infekci a dále každou další hodinu až do doby 7 hpi, jsme odebrali a zafixovali dvě sklíčka (duplikáty). Vzorky jsme označili metodou nepřímé imunofluorescence protilátkou proti DNAJ B14 (červeně) a VP1 (zeleně) stejně jako v předchozím experimentu. Dvacet čtyři hodin po infekci jsme zafixovali poslední vzorky s infikovanými buňkami, které jsme označili protilátkou proti LT antigenu pro kontrolu úspěšného průběhu infekce. Reprezentativní snímky z konfokálního mikroskopu jsou prezentovány na Obrázek 14. Kvantifikace kolokalizačních míst byla provedena v programu ImageJ pomocí makra „Green and Red Puncta Colocalization“ (kapitola 5.2.6.2). Pro každý čas bylo analyzováno 10 zorných polí pořízených objektivem 63x mikroskopu Carl Zeiss LSM 880 NLO, což celkem odpovídá 136–200 buňkám. Z každého zorného pole byl pořízen snímek jednoho řezu. V Graf 1 jsou vyneseny hodnoty průměrného počtu „foci“ v řezu v čase. Do této analýzy byly zahrnuty pouze buňky, které obsahovali alespoň jeden kolokalizační shluk. V Graf 2 je uvedena průměrná velikost těchto kolokalizačních shluků. Kolokalizace signálu pro VP1 a DNAJ B14 jsme detekovali již dvě hodiny po infekci. Jejich přítomnost byla těžko odhalitelná pouhou optickou analýzou obrazu, jelikož dosahovali nepatrné velikosti ($4,6 \text{ pixelu} - 0,078 \mu\text{m}^2$). Obvykle se takový bod nacházel v analyzované rovině buňky pouze jeden a to u přibližně 10% analyzovaných buněk (Graf 3). Výskyt „foci“ v buňkách se zvyšoval v čase a maxima dosáhl 5 hodin po infekci s průměrným počtem 6,6 shluků na buňku (Graf 1). Jak ilustruje obrázek 4 v některých buňkách byl počet míst s kolokalizací výrazně vyšší. Průměrná velikost „foci“ rovněž dosáhla maxima pět hodin po infekci (Graf 2). Zároveň výrazně vzrostlo množství buněk, ve kterých byla kolokalizace detekována (Graf 3). V následující hodině (6 hpi) se výrazně snížil průměrný počet kolokalizací v buňkách, ale jejich velikost klesla pouze mírně. Zároveň byla „foci“ v tuto dobu detekovatelná v nejvyšším množství buněk po celou dobu trvání experimentu (v 51% buněk v analyzované rovině optického řezu). Stav se v další hodině výrazně nezměnil.



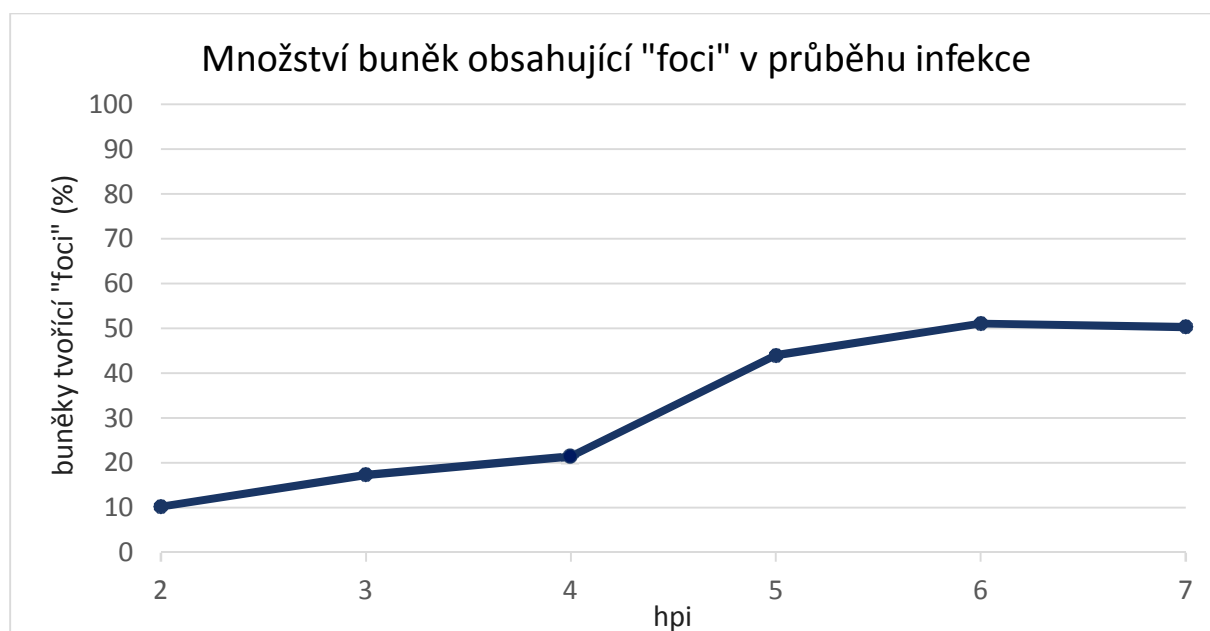
Obrázek 14: **Výskyt VP1 – DNAJ B14 shluků během časně fáze infekce.** Myší fibroblasty 3T6 byly infikovány MPyV s multiplicitou infekce 5. Buňky byly fixované po hodinách od 2 hpi do 7 hpi a imuno fluorescenčně označeny protilátkou proti DNAJ B14 (červená) a VP1 (zelená), jádra jsou označena DAPI (modrá). Na obrázku jsou prezentovány snímky reprezentativních řezů buněk v jednotlivých časech po infekci. Neinfikovaná kontrolní buňka (NK, vlevo nahoře). Kontrola infekce 24 hpi se značeným časným LT antigenem (zelená) – vpravo dole. Úsečky odpovídají 20 μm . Kvantifikace tohoto experimentu je uvedena v grafech 1 a 2.



Graf 1: Výskyt VP1 – DNAJ B14 „foci“ během časné fáze infekce. Myší fibroblasty 3T6 byly infikovány MPyV (F2) s multiplicitou infekce 5. Buňky byly fixovány v indikovaných časech a proteiny DNAJ B14 a VP1 imunofluorescenčně označeny. Pro každý vzorek byly pořízeny snímky řezu buňkami v deseti zorných polí. Počet „foci“ na snímcích z konfokálního mikroskopu byl analyzován v programu ImageJ makrem „Green and Red Puncta Colocalization“. V grafu jsou vyneseny hodnoty pro průměrný počet „foci“ v jednom řezu buňkou. Buňky, ve kterých nebyla nalezena žádná kolokalizace, nejsou do analýzy zahrnuty.



Graf 2: Průměrná velikost VP1 – DNAJ B14 „foci“ během časné fáze infekce. Myší fibroblasty 3T6 byly infikovány divokým kmenem myšího polyomaviru (F2) s multiplicitou infekce 5. Buňky byly 2–7hpi fixovány a imunofluorescenčně označeny proteiny DNAJ B14 a VP1. Pro každý vzorek byly pořízeny snímky řezu buňkami v deseti zorných polí. Velikost „foci“ na snímcích z konfokálního mikroskopu byl analyzován v programu ImageJ makrem „Green and Red Puncta Colocalization“. V grafu jsou vyneseny hodnoty pro průměrnou velikost „foci“ v analyzovaném řezu.

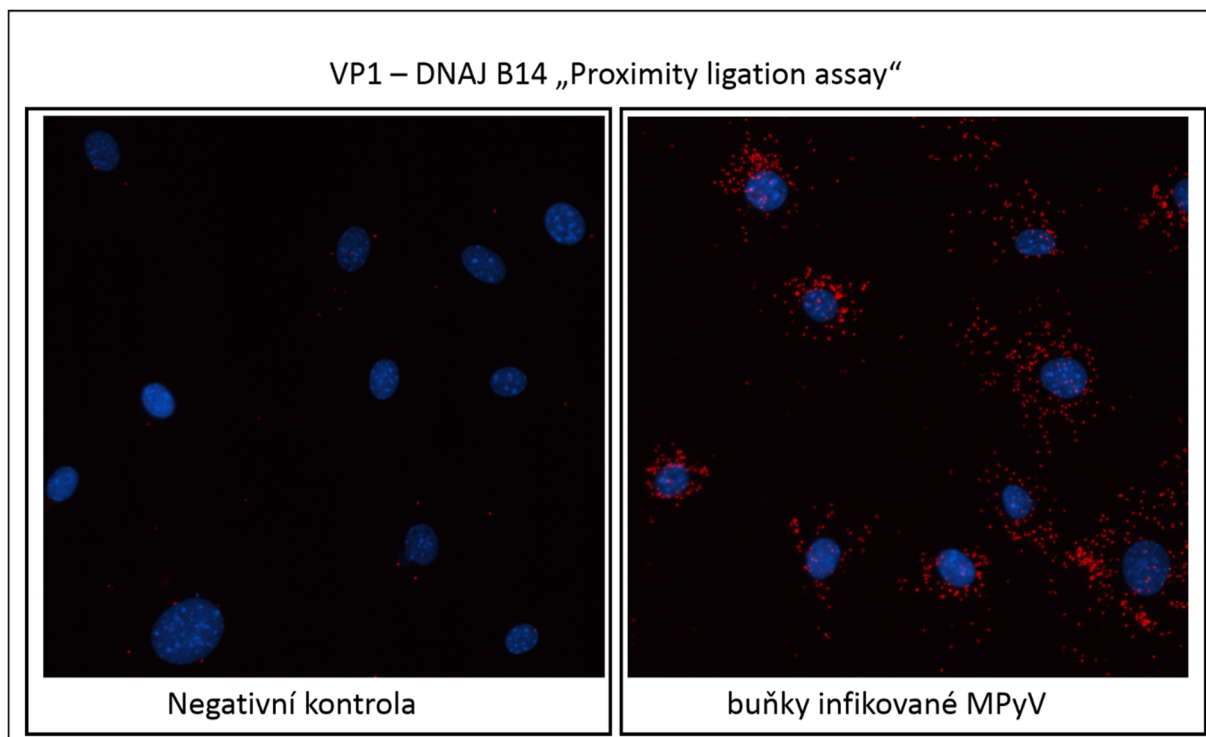


Graf 3: **Množství buněk obsahujících „foci“.** Myší fibroblasty 3T6 byly infikovány divokým kmenem myšího polyomaviru (F2) s multiplicitou infekce 5. Buňky byly fixovány v uvedených časech po infekci a imunofluorescenčně označeny proteiny DNAJ B14 a VP1. Pro každý vzorek byly pořízeny snímky řezu buňkami v deseti zorných polí. Výskyt „foci“ na snímcích z konfokálního mikroskopu byl analyzován v programu ImageJ makrem „Green and Red Puncta Colocalization“. V grafu je vyneseno množství buněk (%) obsahujících v analyzovaném řezu alespoň jedno „foci“.

6.1.4 Testování vzdálenosti DNAJ B14 a VP1 v buňce metodou „proximity ligation assay“

Kolokalizace imunofluorescenčního signálu má pouze omezenou výpovědní hodnotu o reálné vzdálenosti mezi zkoumanými proteiny a o jejich interakcích. Pro další testování jsme využili systému „proximity ligation assay“ (PLA) Duolink. Jedná se o metodu, při které je detekován signál pouze v případě, je-li vzdálenost mezi testovanými proteiny menší než 40 nm. Testování jsme provedli pět hodin po infekci, tedy v době, kdy je výskyt VP1 - DNAJ B14 kolokalizací nejvyšší.

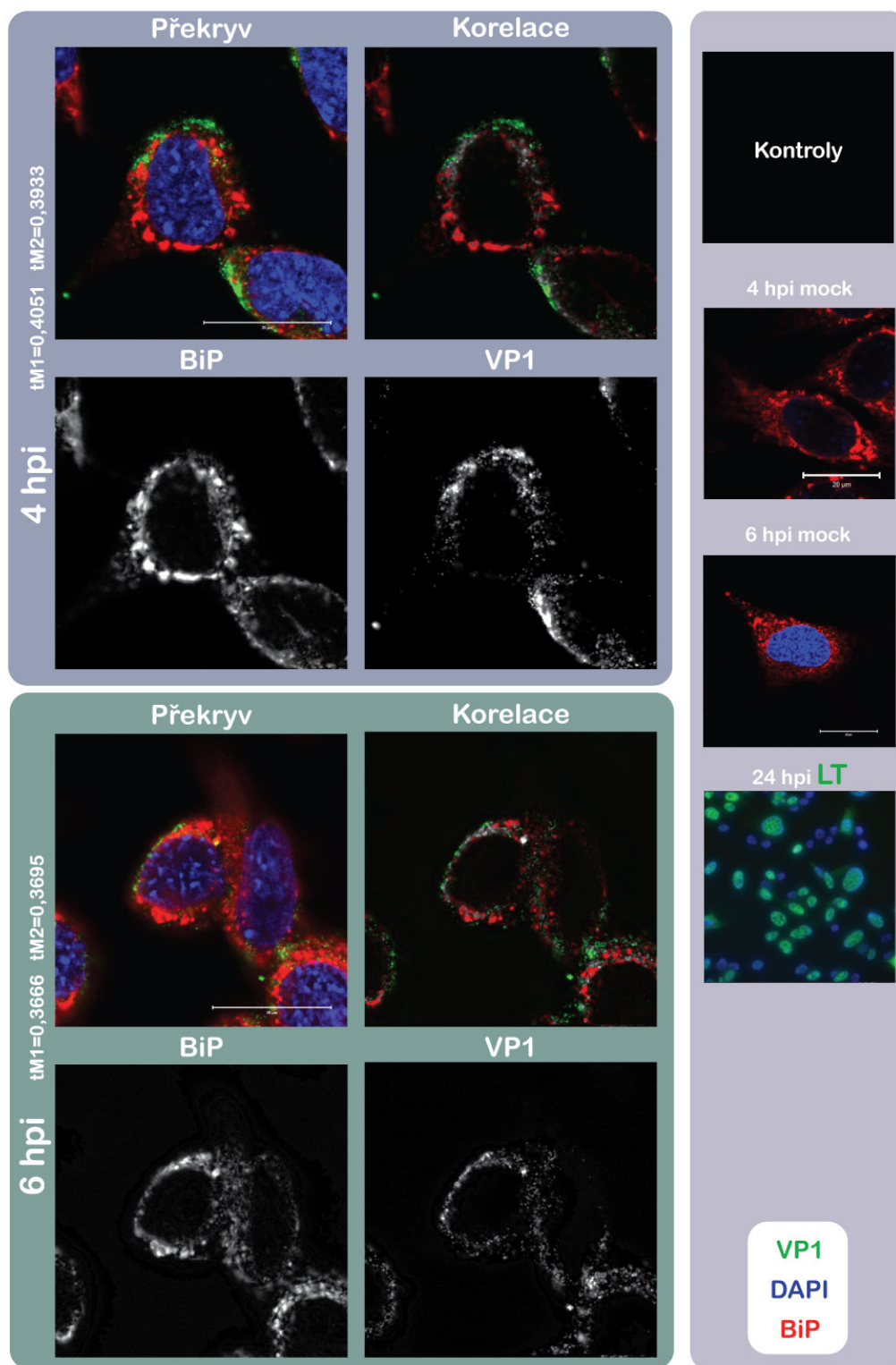
Zatímco v neinfikovaných buňkách jsme detekovali pouze nepatrná množství signálu představující pozadí (červené body), v infikovaných buňkách se jej nacházelo velké množství (Obrázek 15). Kromě samostatných červených bodů jsme pozorovali i místa s nahromaděním signálu, která nejspíše odpovídají velkým kolokalizačním shlukům pozorovaným konfokální mikroskopií (Obrázek 12Obrázek 13Obrázek 14). Při dalším použití tohoto detekčního systému v různých časech po infekci bylo nejvíce signálu detekováno 5 hpi (ústní sdělení Sandra Huerfano), což je ve shodě s výsledky kvantifikací kolokalizace v kapitole 6.1.3.



Obrázek 15: **DNAJ B14 a VP1 se v časných fázích infekce dostávají do vzájemné blízkosti.** Myší fibroblasty 3T6 byly infikovány MPyV v množství odpovídající 15 ng virové genomové DNA, nebo byly ponechány neinfikované (NK). Pět hodin po infekci byly buňky zafixovány a označeny pomocí systému „proximity ligation assay – Duolink“ za použití primárních protilátek proti DNAJ B14 a VP1. Červené body jsou místa, kde proběhla ligace, tedy tam, kde nebyly proteiny vzájemně vzdálenější než 40 nm. Vlevo jsou neinfikované buňky, vpravo buňky infikované MPyV. Obrázky byly pořízeny v rámci experimentu prováděného B. Ryabchenkem

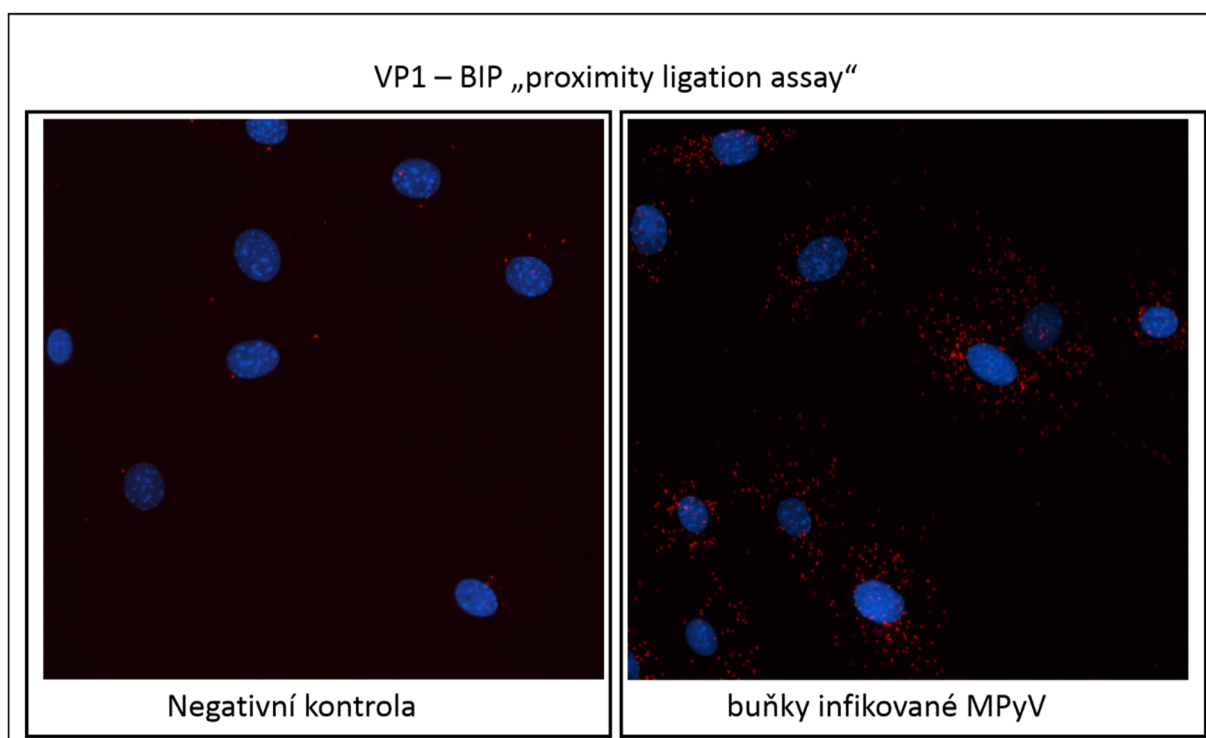
6.1.5 Studium výskytu VP1 s BIP v časně fázi infekce

Dalším proteinem ER, jehož interakce s MPyV v časně fázi infekce nás zajímaly je protein BiP. Zajímalo nás, zda budeme schopni pozorovat kolokalizaci proteinů VP1 a BiP a zda se bude lišit míra této kolokalizace v době před a po nejvyšším výskytu DNAJ B14-VP1 „foci“ (kapitola 6.1.3). Z tohoto důvodu jsme zvolili testovací časy 4 hpi a 6 hpi. Jako kontrolu průběhu infekce jsme testovali přítomnost LT antigenu 24 hpi. Experiment jsme provedli stejným způsobem jako v předchozích případech (kapitola 6.1.2), s použitím třetí pasáže buněk 3T6. Buňky jsme označili protilátkami proti proteinům VP1 a BiP (kapitola 5.1.4). V obou testovaných časech jsme detekovali částečnou kolokalizaci signálu pro BiP a VP1 (Obrázek 16). Překvapivě jsme nepozorovali výraznou změnu v množství kolokalizace ve 4 a 6 hodinách po infekci. Rovněž jsme nepozorovali změnu lokalizace proteinu BiP během infekce, ani jeho akumulaci okolo virionů.



Obrázek 16: **Lokalizace VP1 a BiP v časně fázi infekce.** Myší fibroblasty 3T6 byly infikovány MPyV multiplicitou infekce 5, nebo byl proces infekce proveden médiem bez viru (mock kontroly, pravý panel). Buňky byly fixované 4 nebo 6 hpi a metodou nepřímé fluorescence byly označeny proteiny BiP (červená), VP1 (zelená) a jádra byla označena DAPI (modrá). Na obrázku je prezentované červený a zelený kanál zvlášť v bílé; spodní obrázky obou panelů. Uvedena je i kolokalizační korelace na které jsou stupněmi šedi vyznačené pixely, kde byl detekován červený i zelený signál, vedle snímků jsou uvedeny Menderovi koeficienty kolokalizace tM1 (červený kanál) a tM2 (zelený kanál). Kontrola infekce 24 hpi se značeným LT (zelená) je uvedena vpravo dole. Úsečky odpovídají 20 μ m.

Protein BiP je silně abundantní protein, který se používá jako marker endoplasmatického retikula. Výskyt kolokalizace sledovaného proteinu s BiP vypovídá pouze o přítomnosti proteinu v ER. Abychom ověřili, že se proteiny VP1 a BiP dostávají do vzájemné blízkosti, otestovali jsme infikované buňky 5 hpi metodou PLA (Obrázek 17). Na snímcích je zřejmý výrazný rozdíl mezi neinfikovanou negativní kontrolou (vlevo) a buňkami infikovanými MPyV (vpravo). VP1 se tedy během infekce dostává do vzdálenosti minimálně 40 nm od proteinu BiP. Podobně jako při studiu DNAJ B14 jsme i v tomto případě v některých buňkách pozorovali shluky signálu.



Obrázek 17 – **BiP a VP1 se v časných fázích infekce dostávají do vzájemné blízkosti.** Myší fibroblasty 3T6 byly infikovány MPyV v množství odpovídající 15 ng virové genomové DNA, nebo byly ponechány neinfikované (NK). Pět hodin po infekci byly buňky zafixovány a označeny pomocí systému PLA za použití primárních protilátek proti BiP a VP1. Červené body jsou místa, kde proběhla ligace, tedy tam, kde nebyly proteiny vzájemně vzdálenější než 40 nm. Vlevo jsou neinfikované buňky, vpravo buňky infikované MPyV. Obrázky byly provedené B. Ryabchenkem

6.2 Mutagenese kapsidového proteinu VP2

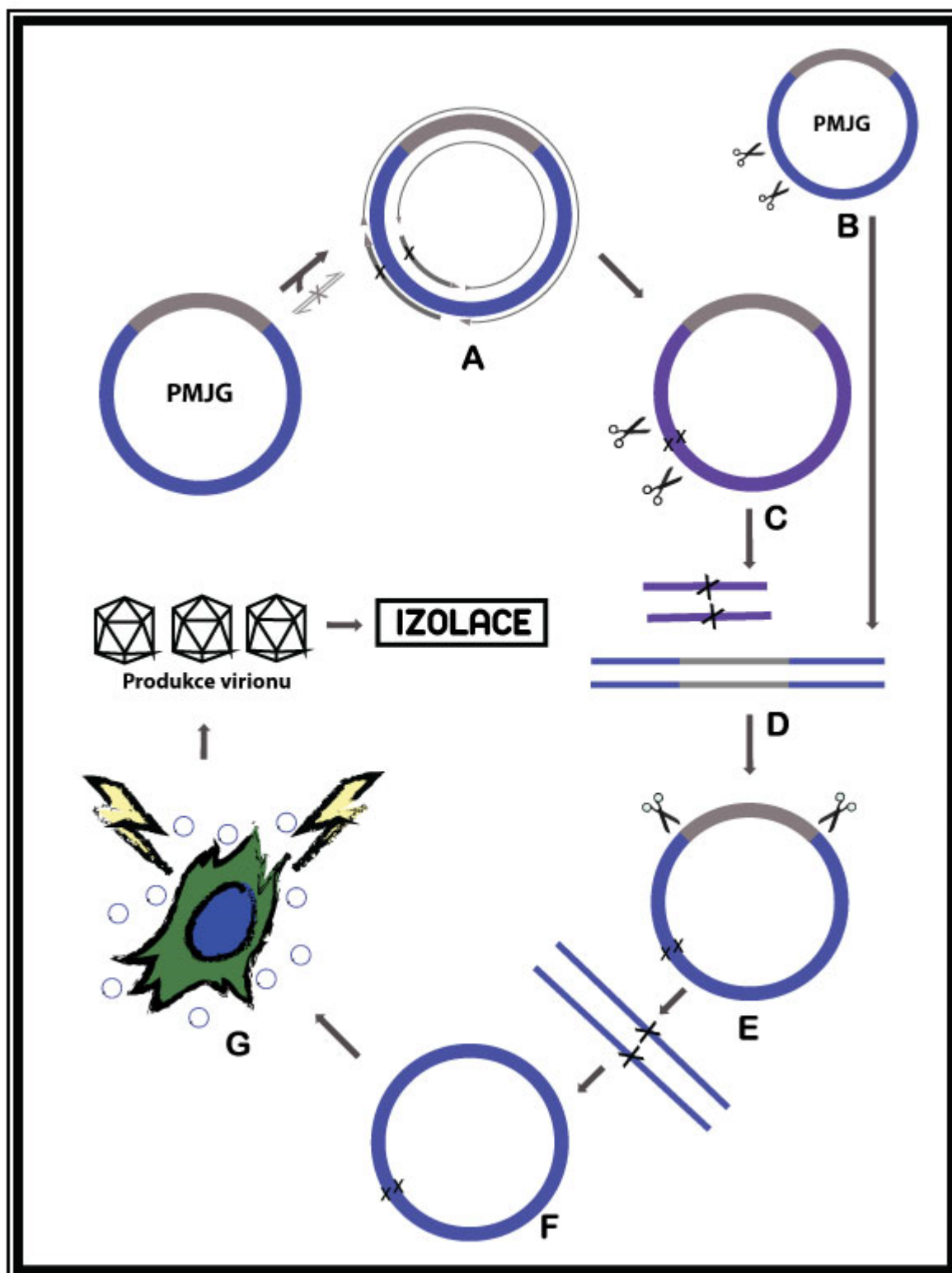
Dalším cílem této práce bylo vytvořit dvě mutanty MPyV v záporně nabitých aminokyselinách N konce VP2 abychom mohli dále testovat roli těchto aminokyselinových zbytků v infekčním cyklu viru. V prvním případě jsme chtěli nahradit kyselinu asparagovou za neutrální alanin v pozici 10 a v druhém případě jsme chtěli zavést substituci kyseliny glutamové za alanin v pozici 17. Tyto dvě aminokyseliny v kontextu proteinové sekvence VP2 jsou barevně vyznačeny na Obrázek 18.

Aminokyselinová sekvence VP2 MPyV:

```
1 MGAALTILVDD LIEGLAEVST LTGLSAEAIL SGEALAALDG EITALTLEGV MSSETALATM
61 GISEEVYGFV STVPVFNRT AGAIWLMQTV QGASTISLGI QRYLHNEEVP TVNRNMALIP
121 WRDPALLDIY FPGVNQFAHA LNVVHDWGHG LLHSVGRYVW QMVVQETQHR LEGAVRELTV
181 RQHTHTFLDGL ARLLNTRWV VSNAPQSAID AINRGASSVS SGYSSLSDYY RQLGLNPPQR
241 RALFNRIEGS MGNNGGPTPAA HIQDESGEVI KFYQAPGGAH QRVTPDWMLP LILGLYGDIT
301 PTWATVIEED GPQKKKRRRL
```

Obrázek 18 –**Aminokyselinová sekvence proteinu VP2 MPyV**. V rámečku je uvedena celá sekvence proteinu VP2. Aminokyseliny určené pro substituci jsou barevně označeny – D10 zeleně a E17 fialově.

K zavedení mutace do genomu MPyV jsme se rozhodli pro následující přístup: Použít plasmid pMJG, který obsahuje celou sekvenci genomu MPyV (kapitola 5.1.7) a cílenou mutagenézí do něj zavést požadovanou změnu v sekvenci. Jelikož při tomto procesu může docházet k chybám v přepisu sekvence a kontrola pomocí sekvenace celého plasmidu by byla náročná a neekonomická, rozhodli jsme se z plasmidu vyštěpit krátký úsek s mutací a vložit ho na stejné místo do plasmidu pMJG, který mutagenézí neprošel. Dalším krokem je vyštěpit genom MPyV z plasmidu a cirkulizovat ho. K tomu lze použít restrikční místo pro EcoRI, přes které byla genomová DNA do plasmidu původně vložena. Takto vyprodukovaný genom následně použít k transfekci savčích buněk kde by se měly vytvořit infekční viriony. Celé schéma je na Obrázek 19.



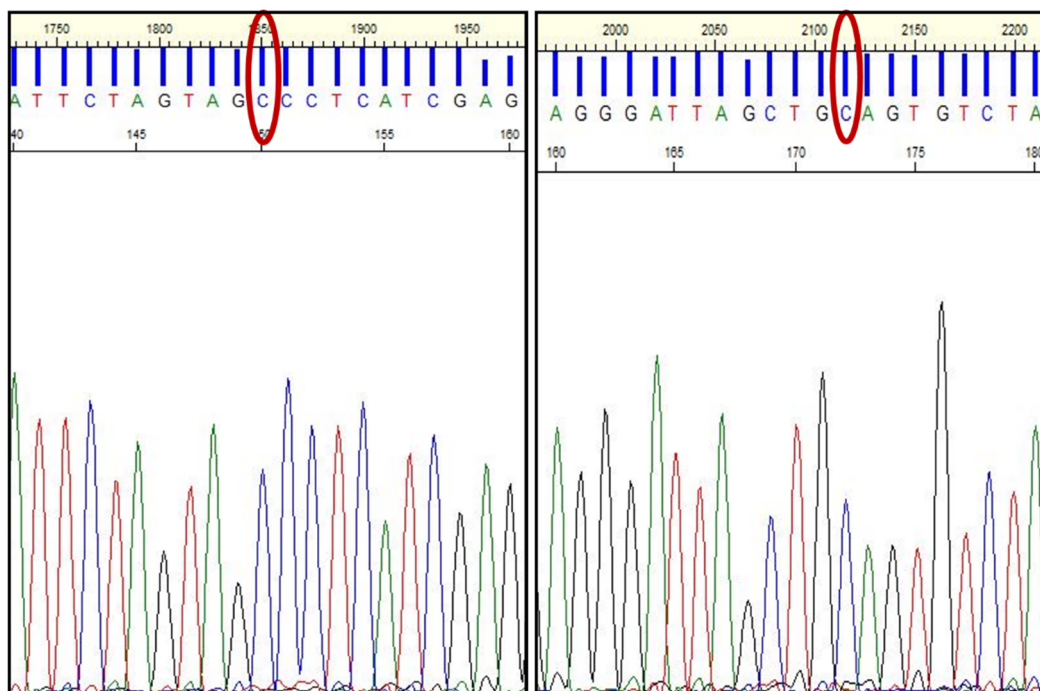
Obrázek 19: Schéma přípravy mutantů MPyV s mutacemi D10A a E17A v kapsidovém proteinu VP2. Do plasmidu pMJG je vnesena změna sekvence cílenou mutagenezí (A). Z plasmidu je vystřížen krátký úsek nesoucí mutaci (C), čerstvý plasmid pMJG, který neprošel mutagenezí je sestřížen stejným způsobem (B), krátký úsek nesoucí mutaci je ligací vložen do vektoru v pMJG (D), virová genomová DNA je vystřížena z plasmidu (E) a ligována (F). Virovým genomem jsou tranfekovány myší fibroblasty 3T6 (G), v kterých probíhá produkce virového potomstva, které může být následně izolováno.

Pro cílenou mutagenezi jsme použili *in vitro* systém GENEART. Mutace se zavede pomocí PCR reakce ze dvou překrývajících se primerů s opačnou polaritou, které nesou požadovanou změnu sekvence, vzniklé PCR produkty se cirkulizují rekombinací. Podle doporučení výrobce jsme navrhly primery pro mutagenezi o délce 35 – 37 bází se zavedenou změnou sekvence uprostřed (kapitola 5.1.8). V obou případech jsme zavedli změnu jedné báze. V případě mutanty D10A jsme navrhly záměnu kodónu GAC kódující aspartát za kodón GCC kódující alanin, u mutanty E17A jsme zaměnili kodón GAA (glutamát) za kodón GCA (alanin). Navržené změny v sekvenci jsou vyznačeny na Obrázek 20.

WT	ATGGGAGCCGCACTGACTATTCTAGTAGACCTCATCGAGGGATTAGCTGAAGTGTCTACC
D10->A	ATGGGAGCCGCACTGACTATTCTAGTAGGCCCTCATCGAGGGATTAGCTGAAGTGTCTACC
E17 -> A	ATGGGAGCCGCACTGACTATTCTAGTAGACCTCATCGAGGGATTAGCTGCAGTGTCTACC

Obrázek 20: **Navržená změna sekvence pro mutagenezi.** Prezentován je začátek sekvence kódující protein VP2 (odpovídá (+) vlákně). Žlutě jsou vyznačena místa mutagenese s původní sekvencí, zeleně jsou vyznačeny navržené změny v sekvenci pro mutantu D10A a E17A.

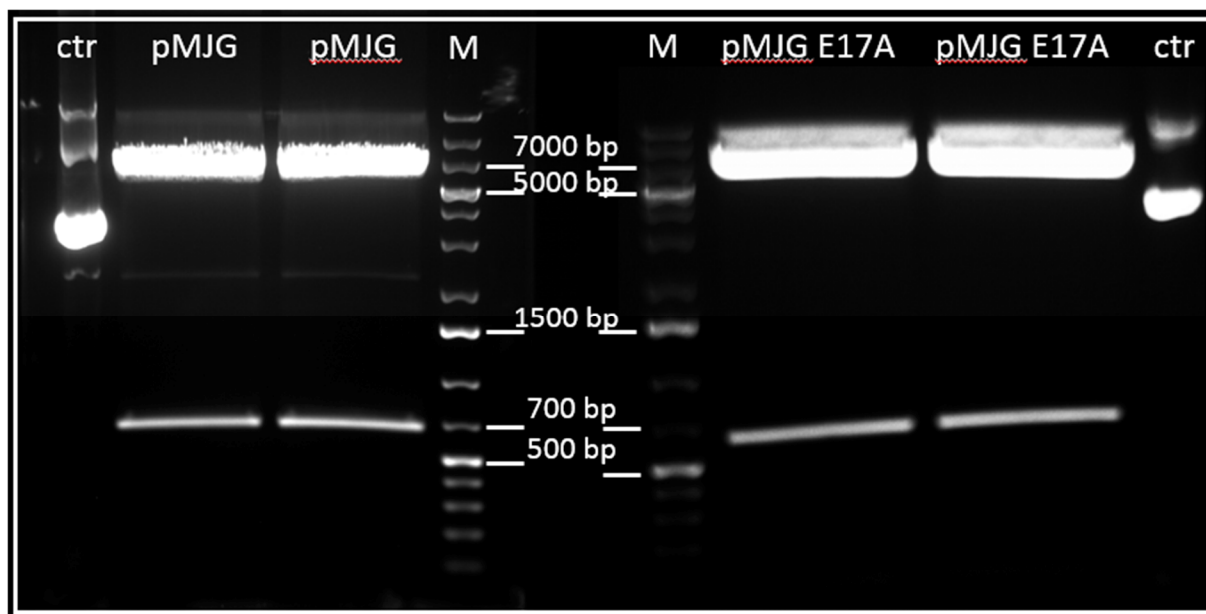
Pomocí zmíněného systému Geneart jsme provedli PCR reakci, rekombinaci a vyprodukovanou DNA jsme transformovali do *E. Coli* DH5alfa-T1R teplotním šokem. Transformované bakterie jsme v různém ředění kultivovali na selekčních miskách s ampicilinem. Pět nebo šest vybraných, přes noc narostlých kolonií jsme namnožili v tekutém LB médiu (5 ml), část jsme uložili v podobě konzervy a část jsme použili pro izolaci DNA minipreparací a následnou sekvenaci. Výtěžky izolace DNA změřené spektrofotometricky se pohybovaly od 140 – 170 ng/μl. Pro sekvenační reakci jsme zvolili primer „sek_N_VP2“, který jsme navrhli tak, aby získaná sekvence pokrývala oblast s plánovanou substitucí. V případě D10A byla mutace úspěšně vnesena ve 4 z 5 vybraných kolonií, v případě E17A byla změna sekvence přítomná u všech testovaných kolonií, v jedné případě došlo k aditivní náhodné mutaci v osekvenovaném úseku. Pro obě mutanty byla vybrána jedna z kolonií nesoucí mutovaný plasmid pojmenovaný pMJG D10A a pMJG E17A, která byla použita pro další postup. Chromatografy sekvence plasmidů z těchto vybraných kolonií pokrývající oblast se zavedenou změnou nukleotidu jsou uvedeny na Obrázek 21. Chromatografy naznačují, že během manipulací s koloniemi nedošlo ke smíšení s jinou populací a kultury jsou monoklonální.



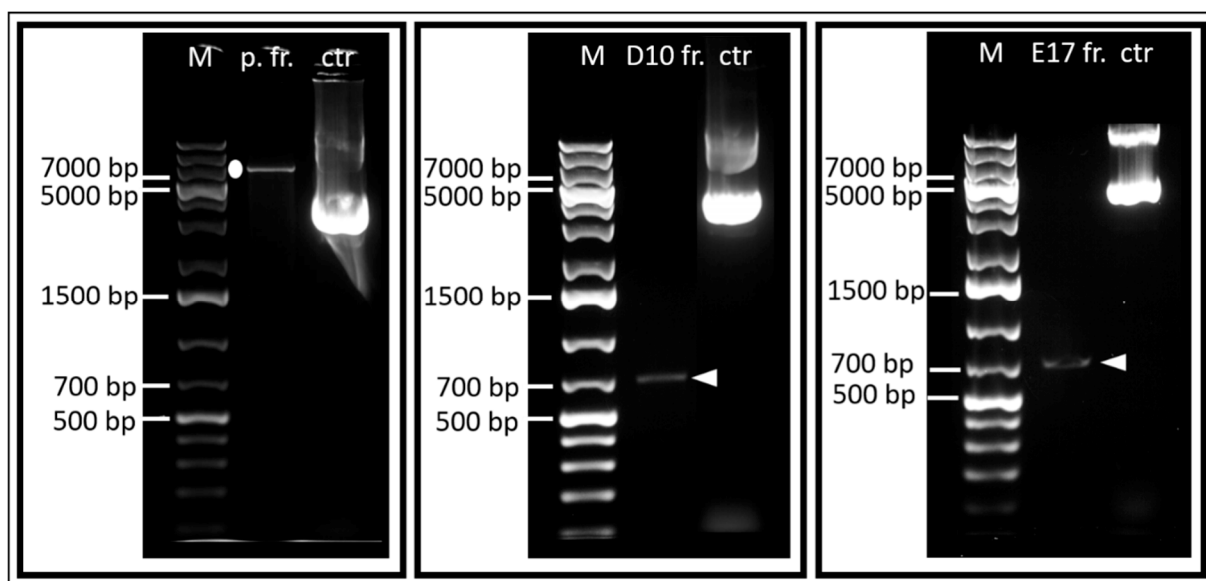
Obrázek 21: **Chromatograf sekvenace plasmidu pMJG po mutagenezi.** Plazmidová DNA byla vyizolovaná z bakteriální kultury a osekvenovaná. Vlevo je pMJG D10A, vpravo pMJG E17A. Červeně je zakroužkovaný substituovaný nukleotid.

Vybrané kolonie byly z konzerv postupně namnoženy do velkého objemu (nejprve v 5ml, pak v 250 ml LB s ampicilínem) a maxipreparací z nich byl vyizolována plasmidová DNA.

Takto vyizolované plasmidy pMJG D10A, pMJG E17A jsme použili k vyštěpení fragmentu obsahující mutované místo. Vybrali jsem restrikční místa pro enzymy EHE1 (Sfo1, pozice 7570 plasmidu) a XMAJ1 (Avr1 II, pozice 585 plasmidu), které se v plasmidu nacházejí pouze jednou, jsou od sebe vzdálená 672 nt a nachází se mezi nimi sekvence kodující N konec VP2. Oba enzymy jsou aktivní ve stejném pufru (Tango). Zatímco štěpením EHE1 vznikají tupé konce, XMAJ1 produkuje lepidé konce, což je důležité pro orientaci fragmentu při ligacích. Pro restrikční reakci jsme použili 10 µg plasmidové DNA. Po proběhnutí reakce jsme celý objem přenesli do 1% agarózový gel a elektroforeticky rozdělili při 4,4V/cm (Obrázek 22). Proužek v oblasti odpovídající velikosti přibližně 700 bp jsme vyjmuli skalpelem a z vyjmuté části gelu jsme izolovali DNA. Abychom mohli vložit izolovaný fragment DNA do plasmidu, museli jsme si připravit pMJG s vystřiženou oblastí mezi restrikčními místy XMAJ1 a EHEJ1. Rozdělení fragmentů jsme provedli v 0,8% agarózovém gelu při 2,5V/cm. Z gelu jsme izolovali fragment nacházející v oblasti odpovídající markeru 7000 bp (očekávaná velikost 6985 pb, Obrázek 22). Ze snímku je patrné, že nedošlo ke kompletnímu doštěpení plasmidu.



Obrázek 22: Výsledek štěpení plasmidů enzymy XMAJ1 a EHE1. Po proběhnutí restrikční reakce a její inaktivace byl roztok s plasmidem pMJG E17A nebo D10A smíchán s nanášecí barvou a přenesen na 1% (vpravo) agarózový gel a pMJG na 0,8% (vlevo) gel. Snímek gelu s plasmidem pMJG D10A nebyl pořízen. M – marker molekulových vah, ctr – neštěpený plasmid.

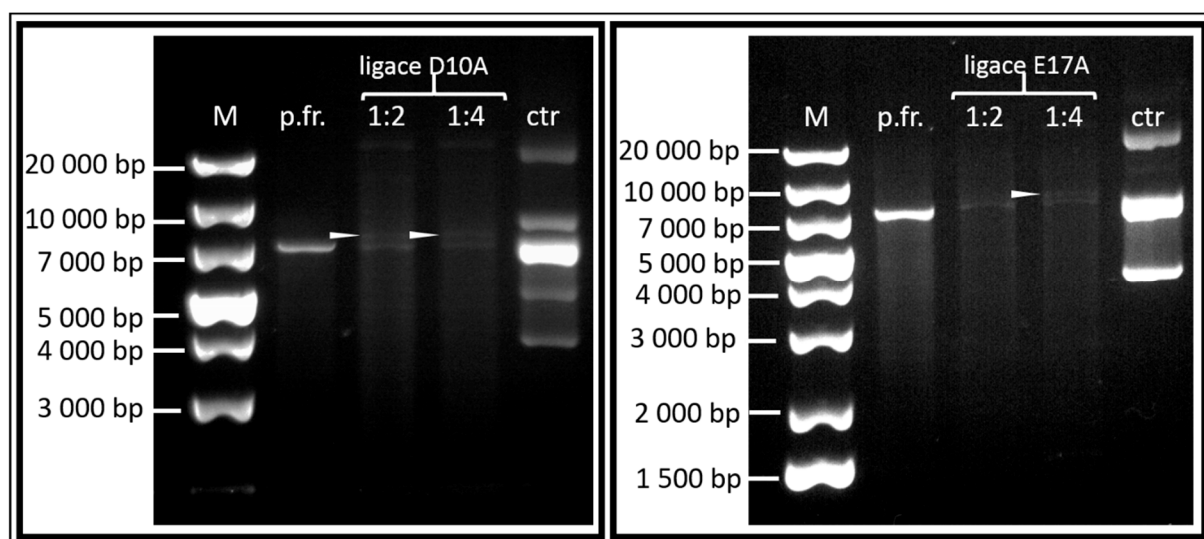


Obrázek 23: Výsledek izolace DNA z gelu. Do 1% agarózového gelu bylo naneseno 15 μ l roztoku s DNA izolované z gelu. Bílým kolečkem je označen proužek DNA s velikostí okolo 7000 bp a trojúhelníkem jsou označeny proužky DNA s velikostí okolo 700 bp. M-marker molekulových hmotností, p.fr. – izolace fragmentu o délce 6985 bp vyštěpeného z pMJG, D10 fr. – izolace fragmentu o délce 672 bp vyštěpeného z pMJG D10A, E17 fr. – izolace fragmentu o délce 672 bp vyštěpeného z pMJG E17A, ctr – neštěpený plasmid.

Výtěžek vyizolované DNA z gelu činil ve všech případech pouze několik ng/ μ l a poměry absorbancí značily znečištění DNA vzorku. Při izolaci DNA z gelu jsou nicméně takovéto výsledky běžné. Ověřili jsme si přítomnost DNA o správné velikosti bez příměsí dalších

fragmentů pomocí elektroforézy v agarózovém gelu (Obrázek 23). V případě izolace fragmentu o velikosti 6985 bp došlo během procesu k degradaci a příprava musela být opakována.

Následně jsme přistoupili k vnesení fragmentu (672 nt) obsahující mutaci vyštěpeného z pMJG D10A nebo z pMJG E17A do vektoru pMJG (6985 bp). Ligaci jsme provedli v molárním poměru vektoru k insertu 1:2 a 1:4 (kapitola 5.2.3.6), abychom pokryli širší rozsah a našli vhodný poměr, při kterém je reakce efektivní. Vzorky jsme po inaktivaci reakce analyzovali elektroforeticky (Obrázek 24). Ve všech případech jsme detekovali dvě populace DNA s mírně odlišnou mobilitou. Populace s menší velikostí DNA odpovídá mobilitou vyštěpenému vektoru pMJG (6985 bp, porovnejme 2 sloupec s 3 a 4). Na obrázku jsou vyznačeny proužky se změněnou mobilitou, které pravděpodobně reprezentují vektor s vloženým mutovaným fragmentem. Tento proužek je zřetelnější u vzorků, kde byl použit molární poměr 1:4.



Obrázek 24: **Vložení úseku DNA nesoucí mutaci do vektoru.** Elektroforéza probíhala v 0,8% agarózovém gelu. Šipky označují proužky se sníženou mobilitou, které se vytvořily po proběhnutí ligace. M - marker, p.fr. - neligovaná vektorová DNA o velikosti 6985 bp, 1:2 – vzorek ligace s molárním poměrem 1:2, 1:4 - vzorek ligace s molárním poměrem 1:4. ctr – neštěpený plasmid.

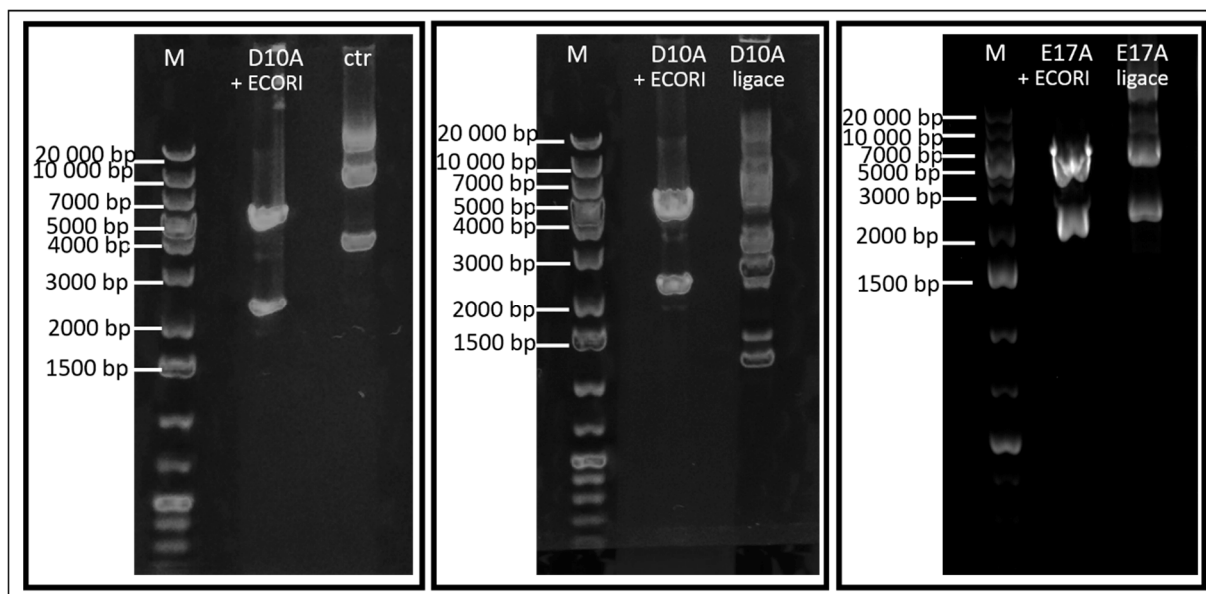
Ligovaný plasmid jsme elektroporačně transformovali do *E.Coli* TOP 10. Na elektroporaci jsme použili 8 ng ligované DNA a 50 µl bakteriální konzervy. Transformované bakterie jsme kultivovali na pevném selekčním médiu (AMP). Na misky jsme přenesli transformační směs ve třech odlišných koncentracích a nechali růst 16 hodin. Ve všech případech vyrostly kolonie. Úspěšnější byla transformace ligační reakce s molárním poměrem vektoru ku inzertu 1:4 a to jak v případě D10A tak E17A. Vybrali jsme šest kolonií, které jsme pomnožili v tekutém LB médiu. Opět jsme část kultury uložili v podobě konzervy a z části jsme izolovali plasmidovou DNA, kterou jsme poslali na analýzu sekvence. Izolované plasmidy jsme pojmenovali pMJG

D10A new a pMJG E17A new. Sekvenační reakce proběhly pro každý izolovaný plasmid dvě. V první analýze byl použit primer „sek_N_VP2“ a v druhé „LT F 7251“ (kapitola 5.1.8). Tyto primery byly zvoleny tak, aby sekvenace pokryla širší oblast a mohli jsme ověřit nejen to, že vložený úsek nese požadovanou mutaci, ale i, že je vložen ve správné orientaci a že nedošlo k žádné další změně sekvenace po celé délce vkládaného úseku. V případě kolonií transformovaných „pMJG E17A new“ neslo pět ze šesti kolonií plasmid s vloženým fragmentem a to ve správné orientaci. V jednom případě nedošlo k vložení tohoto úseku DNA a plasmidová DNA se pouze cirkulizovala. U kolonií transformovaných „pMJG D10A new“ byl fragment nesoucí mutaci přítomný rovněž v pěti případech ze šesti.

Pro další práci jsme vybrali vždy jednu kolonii, kterou jsme namnožili v tekutém médiu LB s ampicilinem do velkého objemu (nejprve v 5 ml pak v 250 ml) a „endotoxin free“ maxipreparací, která umožňuje izolovat DNA bez přítomnosti bakteriálních endotoxinů, jsme získali plasmidovou DNA. Restrikční reakcí enzymem EcoRI jsme z plasmidu vyštěpili virovou genomovou DNA, kterou jsme následně recirkulizovali ligační reakcí ve velkém objemu. Velký objem a nízká koncentrace DNA zvyšuje pravděpodobnost intramolekulární ligace. Dále jsme DNA zkoncentrovali precipitací. Úspěšný průběh restrikce a ligace jsme zkontrolovali elektroforeticky (Obrázek 25). Restrikce dala vznik dvěma proužkům, většímu pohybujícímu se na úrovni markeru o velikosti 5000 bp, což odpovídá velikosti MPyV genomu a druhému menšímu, s velikostí nad 2000 bp, což odpovídá zbytku plasmidové DNA. Po ligaci jsme pozorovali vznik mnoha intermediátů.

Tímto jsme získali virové genomy s vnesenou mutací bez příměsi endotoxinů, které je možné bezpečně použít na transfekci savčích buněk.

Výše popsany postup jsme prováděli pro mutantu D10A a E17A v jiném časovém období, abychom minimalizovali vznik případných kontaminací.



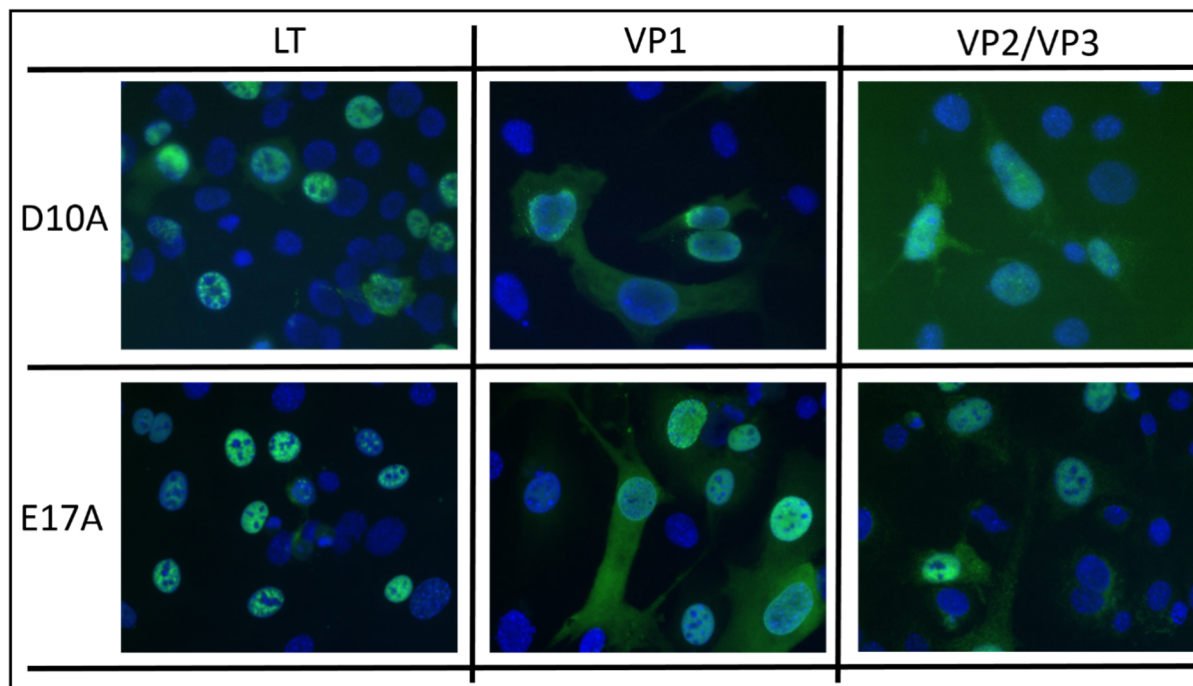
Obrázek 25: **Vyštěpení virové genomové DNA a následná recirkulizace.** Genomová DNA byla z plasmidu pMJG D10A new a pMJG E17A new vyštěpená enzymem EcoRI a následně zaligována a zkoncentrována. Vzorky po proběhnutí reakcí byly přeneseny na 0,8% agarózový gel. Elektroforéza probíhala 2-3 hodiny při 2,5 V/cm. M - marker, ctr – neštěpený plasmid.

6.3 Produkce a charakterizace mutovaného myšího polyomaviru

Ligované mutované genomy MPyV D10A a MPyV E17A jsme transfekovali do myších fibroblastů 3T6. V obou případech jsme provedli 6 nukleofekčních reakcí. Část buněk jsme nechali růst na sklíčkách pro mikroskopii v 24 jamkové destičce. Po 24 hodinách jsme v nich imunofluorescenčně označili LT antigen, hlavní kapsidový proteinu VP1 a společnou část minoritních proteinů VP2/VP3 (Obrázek 26). V obou případech byly v buňkách detekovány všechny tři virové proteiny. Oba mutované genomy jsou schopny exprese a produkce časného LT antigenu i pozdních kapsidových proteinů. Množství buněk produkujících tyto proteiny bylo poměrně vysoké, transfekce tedy proběhla úspěšně.

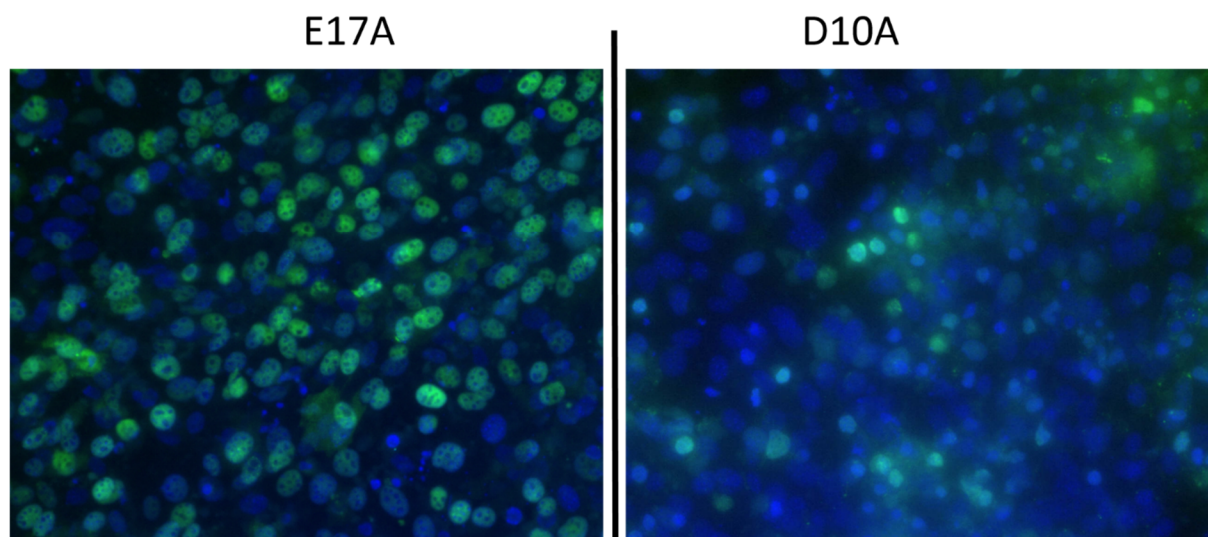
Při další inkubaci transfekovaných buněk jsme pravidelně kontrolovali, zda dochází k cytopatickému efektu. Některé misky s kulturou transfekovanou MPyV E17A jsme museli zamrazit již pátý den, jelikož docházelo k odchlípnutí buněčné vrstvy od povrchu misky. Problém mohl být způsoben použitím pozdní pasáže, která vykazovala velmi rychlý růst. Šestý den jsme odebrali další mikroskopická sklíčka porostlá transfekovanými buňkami a označili je protilátkou proti LT antigenu, abychom zkontrolovali stav probíhající infekce viriony uvolněnými z transferovaných buněk (Obrázek 27). Zatímco většina buněk transfekovaných genomem E17A produkovala LT antigen a v kultuře tedy docházelo k infekcím, v případě genomu D10A jsme produkci LT antigenu detekovali pouze u malého podílu buněk. To může

naznačovat sníženou schopnost mutantních virionů reinfikovat okolní buňky, uvolňovat se z infikovaných buněk, nebo sníženou produkci virionů v buňkách.



Obrázek 26: **Produkce virových proteinů v buňkách transfekovaných genomem MPyV D10A a E17A.** Buňky byly transfekovány genomy MPyV D10A nebo MPyV E17A a po 24 hodinách fixovány. Imunofluorescenčně byly označeny antigeny LT, VP1, a VP2/VP3. Snímky byly pořízeny při zvětšení 400x.

Detekce LT antigenu 6 dní po transfekci

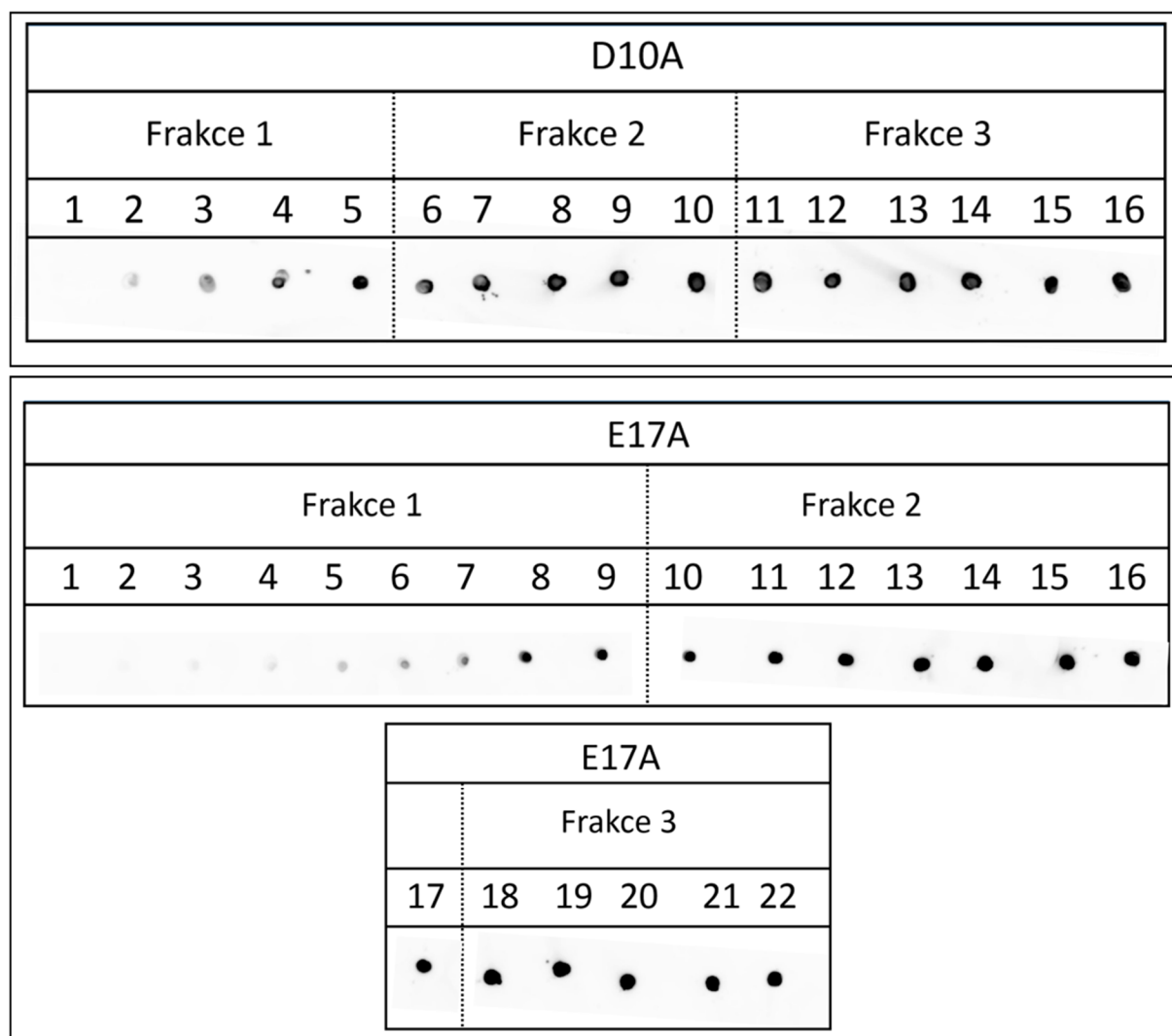


Obrázek 27: **Propagace mutant D10A a E17A v buněčné kultuře.** Buňky 3T6 transfekované genomy D10A a E17A jsme zafixovali 6 dní po transfekci. Metodou nepřímé imunofluorescence jsme je označili protilátkou proti LT antigen (zelená). Jádra jsou značena DAPI (modrá). Snímky byly pořízeny při zvětšení 100x.

Mutované viry jsme izolovali z transferovaných buněk standartním způsobem, centrifugací přes sacharózový polštář a izopyknickou centrifugací v CsCl gradientu. Refraktometrické indexy frakcí vzniklých rozebráním gradientu jsou prezentovány v Tabulka 3. Frakce jsme rovněž testovali metodou „dot blot“ na přítomnost kapsidového proteinu VP1 (Obrázek 28). Dvě maxima signálu VP1 se nacházela okolo frakce 10 a 14 v případě D10A a okolo frakce 14 a 19 v případě E17A. Na základě refraktometrických indexů a výsledků „dot blot“ jsme spojili vzorky do tří frakcí, jak je graficky znázorněno v Tabulka 3 a Obrázek 28, provedli jsme dialýzu spojených frakcí proti B pufru a koncentrovali preparát centrifugací přes sacharózový polštář.

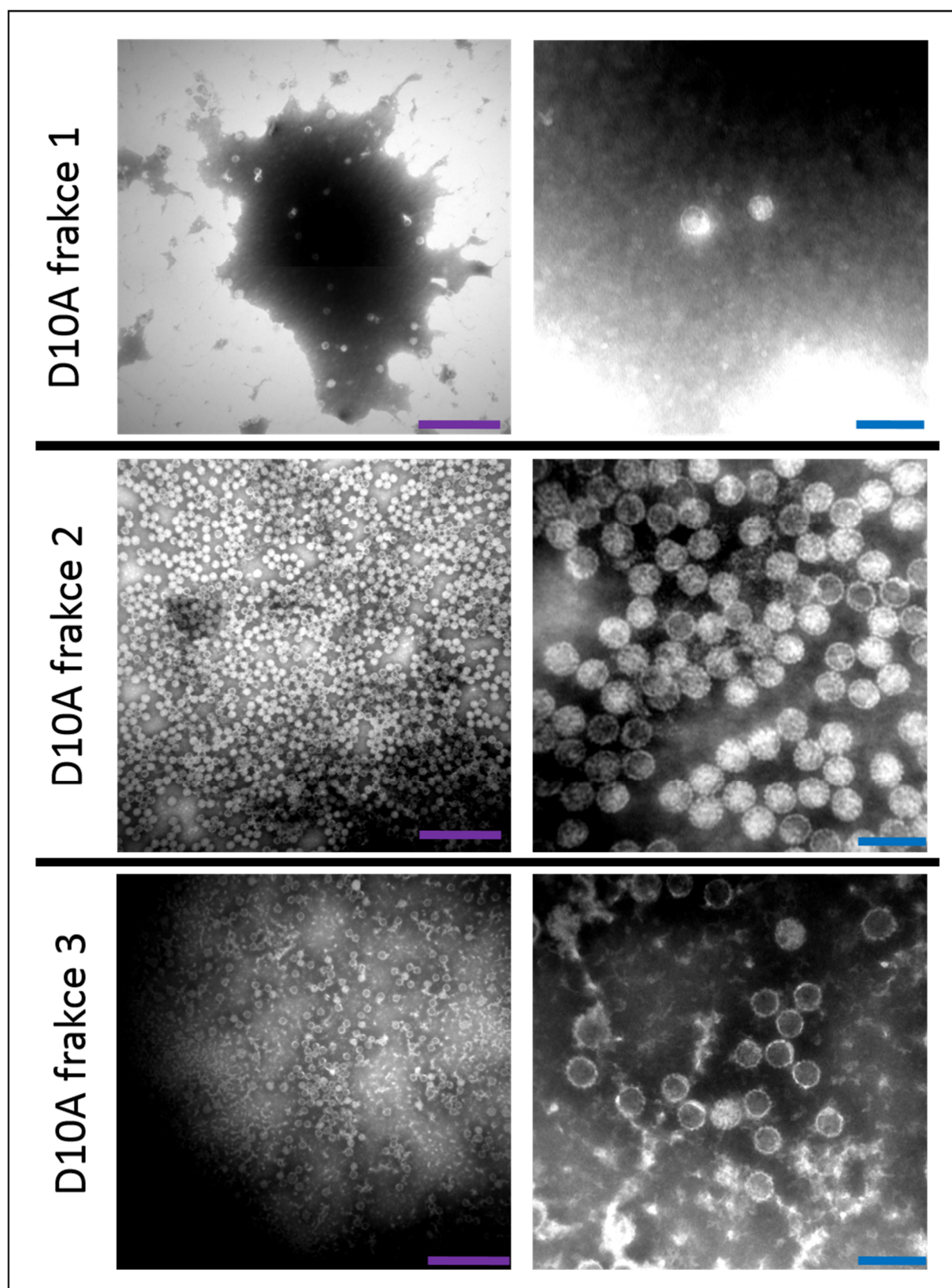
	D10A-(η)		E17A--(η)	
F1	1,376		1,3475	
	1,377		1,3785	
	1,374		1,378	
	1,37		1,376	
	1,368		1,3735	
			1,3715	
			1,37	
			1,3685	
			1,3675	
F2	1,367		1,3665	
	1,3655		1,366	
	1,365		1,3655	
	1,364		1,365	
	1,3635		1,3647	
			1,364	
			1,364	
			1,3635	
F3	1,363		1,3625	
	1,362		1,3615	
	1,361		1,3605	
	1,36		1,359	
	1,359		1,359	
	1,358			

Tabulka 3 – **Refraktometrické indexy a rozdělení do frakcí.** Kultura 3T6 byla transfekována genomy MPyV D10A a E17A. Následně byla provedena izolace viru. Gradienty chloridu cesného byly rozebrány do frakcí o objemu přibližně 0,5 ml. U jednotlivých vzorků byl změřen refraktometrický index uvedený v tabulce. V tabulce je rovněž graficky znázorněno následné spojení původních frakcí do frakce 1 (F1), frakce 2 (F2) a frakce 3 (F3).

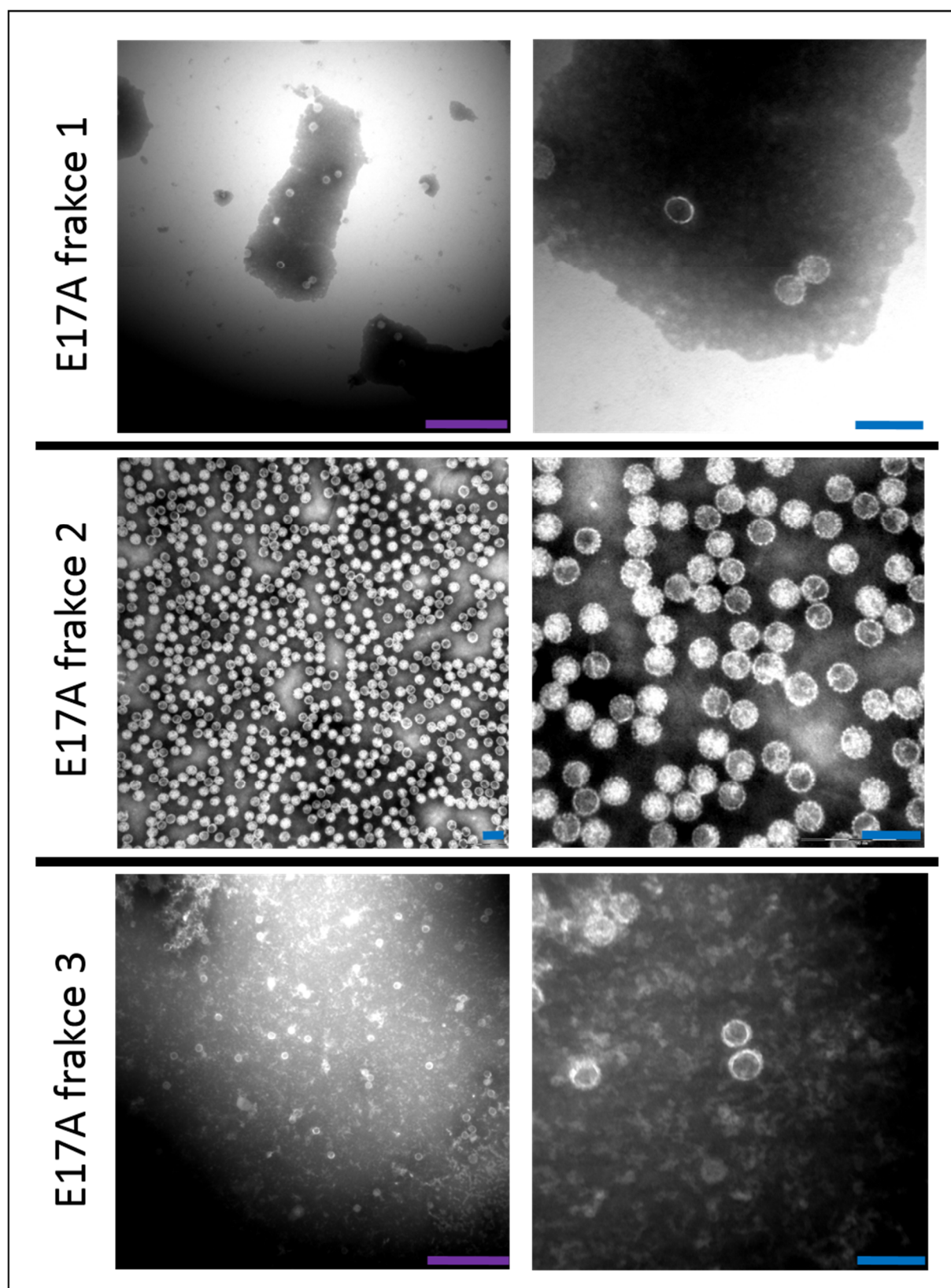


Obrázek 28. **Přítomnost VP1 v jednotlivých frakcích CsCl gradientu.** Gradienty chloridu cesného byly rozebrány do frakcí o objemu přibližně 0,5 ml. Vzorky byly nakapány na celulóзовou membránu. Protein VP1 byl označen myší protilátkou proti VP1 a sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidázou. Gradient D10A – horní panel, gradient E17A – dolní panel.

Získané izobáty (frakce 1, 2, 3) jsme prohlédli v elektronovém mikroskopu (Obrázek 29Obrázek 30). Ve frakci 1 virového inokula D10A se nacházeli volné pentamery a v nízké koncentraci prázdné i plné virové částice. Frakce 2 obsahovala velké množství plných virionů, ale nacházeli se zde rovněž i prázdné partikule. Ve třetí frakci byly nečistoty a prázdné viriony s příměsí plných virionů. První a třetí frakce E17A měla podobné charakteristiky jako v případě D10A. Druhá frakce obsahovala směs plných a prázdných virionů, nicméně v nižším množství. Hemaglutinační titr druhé frakce D10A byl $1,44 \times 10^{11}$ a druhé frakce E17A $3,8 \times 10^{10}$.

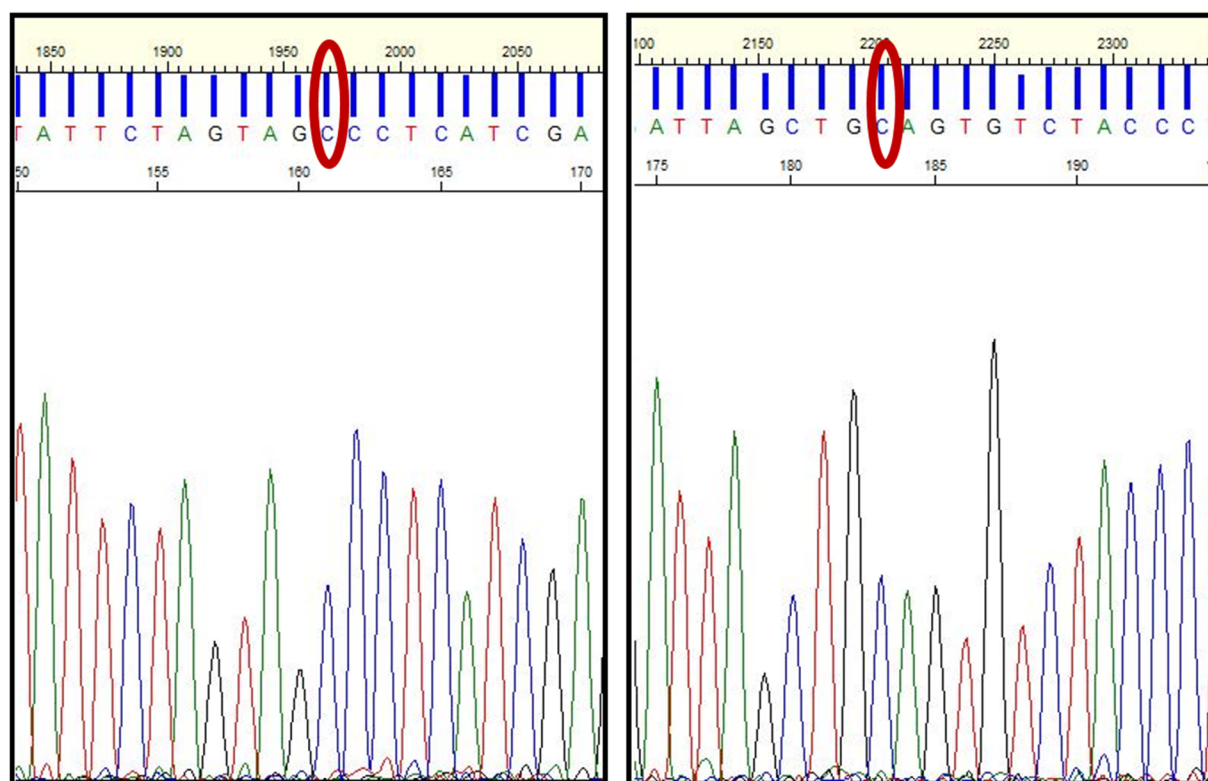


Obrázek 29 - Snímky izolátů myšího polyomaviru D10A z elektronového mikroskopu. Vzorky jednotlivých spojených frakcí byly adherovány na mikroskopické sítě. Frakce 2 byla zředěna 1:1. Kontrast byl zajištěn metodou negativního barvení (PTA). Pro každou frakci je uveden snímek pro dvě odlišná zvětšení Modrá úsečka odpovídá 100 nm a fialová 500 nm.



Obrázek 30 - Snímky izolátů myšího polyomaviru D10A z elektronového mikroskopu. Vzorky jednotlivých spojených frakcí byly adherovány na mikroskopické síťky. Kontrast byl zajištěn metodou negativního barvení (PTA). Pro každou frakci je uveden snímek pro dvě odlišná zvětšení. Modrá úsečka odpovídá 100 nm a fialová 500 nm.

Abychom ověřili, že během produkce nedošlo ke zpětné mutaci nebo kontaminaci, rozhodli jsme se z virionů izolovat DNA. Nejprve jsme virové inokulum inkubovali s DNAsou a degradovali tak jakoukoli DNA, která se nachází vně virionů. Kapsidy jsme rozrušili proteinázou K a DTT. DNA jsme izolovali fenol-chloroformovou extrakcí, precipitovali ji a nechali osekvenovat s primerem sek_N_VP2. V obou případech viriony nesli genom s požadovanou změnou sekvence (Obrázek 31).



Obrázek 31: **Chromatograf sekvence části genomu MPyV D10A a MPyV E17A.** DNA izolovaná z virionů sekvenována s primerem „sek_N_VP2“. Vlevo je DNA MPyV D10A, vpravo MPyV E17A. Červeně je zakroužkovaný substituovaný nukleotid.

6.3.1 Viriony MPyV D10A mají snížený obsah mutovaného minoritního proteinu VP2.

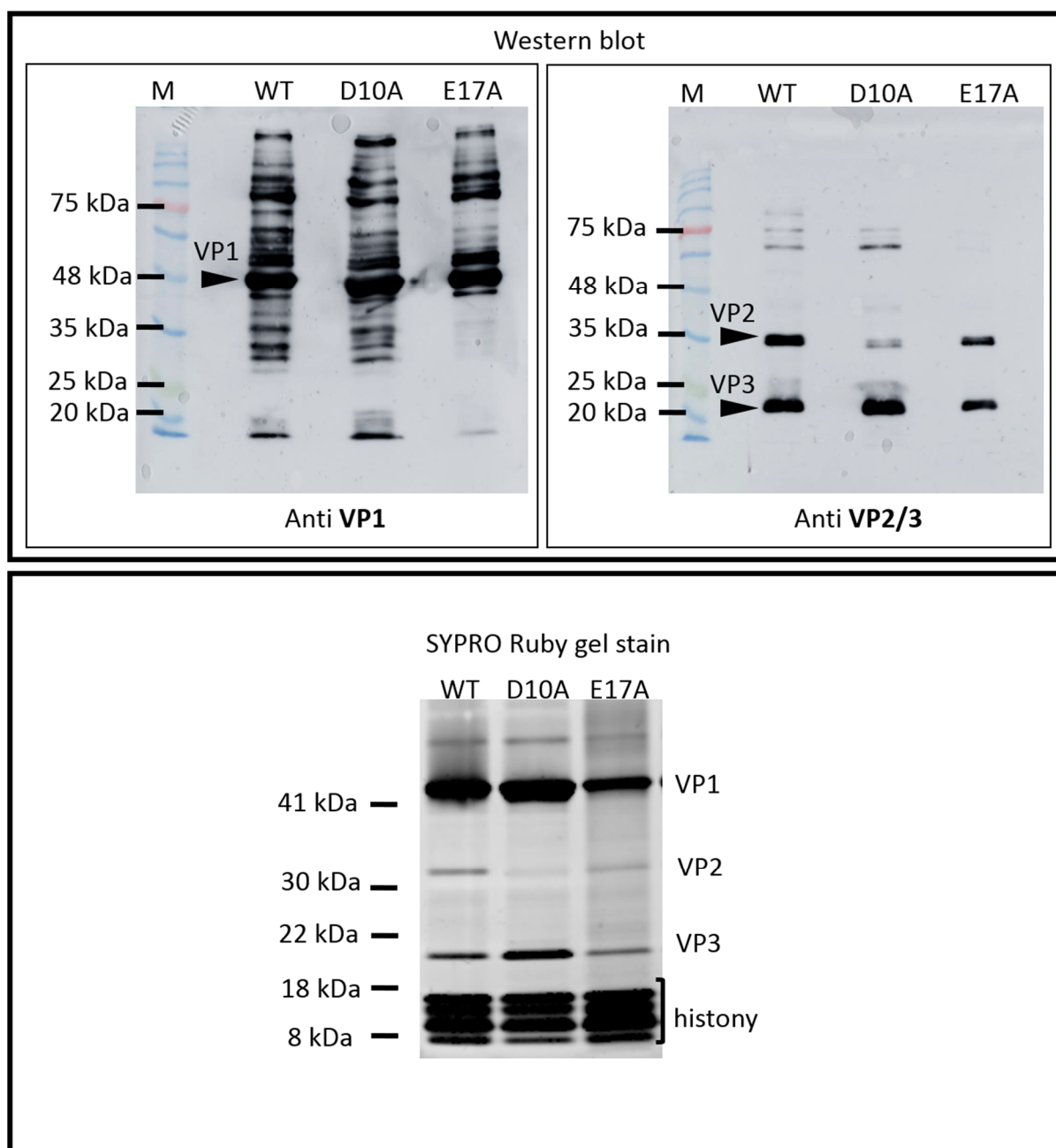
Podle předchozích výsledků je v buňkách transfekovaných genomem MPyV D10A a MPyV E17A produkován hlavní kapsidový protein VP1 a rovněž alespoň jeden z minoritních kapsidových proteinů.

Dalším krokem v charakterizaci mutant bylo ověřit, zda jsou izolované viriony složeny ze všech tří kapsidových proteinů VP1, VP2 a VP3. Druhou frakci mutovaných virů MPyV D10A a MPyV E17A a také MPyV divokého typu (WT) jsme rozdělili elektroforeticky v 10% akrylamidovém gelu (SDS PAGE). Proteiny jsme přenesli na membránu metodou Western blot a poté je označili protilátkou proti VP1 nebo protilátkou proti společné části proteinů VP2/VP3 (Obrázek 32 – horní panel). U všech tří virů jsme detekovali silný proužek odpovídající

velikosti monomerů VP1. Kromě toho byly na membráně protilátkou rozpoznané proužky s odlišnou mobilitou. Jedná se nejspíše o oligomery a degradační produkty VP1.

Dle očekávání se u divokého typu MPyV (WT) nacházeli dva proužky označené protilátkou rozpoznávající společnou část VP2 a VP3, první s mobilitou odpovídající VP2 (35 kDa) a druhý s mobilitou odpovídající VP3 (20 – 25 kDa). Mutanta E17A vykazovala stejný vzor. Poměr denzity proužku VP2/VP3 normalizovaný na poměr VP3/VP3 WT (1) činil 0,998. Nebyl zde tedy téměř žádný rozdíl mezi WT a E17A. U viru D10A jsme snadno rozeznali proužek pro VP3, ale pouze velmi slabý signál pro VP2. Poměr velikosti a intenzity proužku VP2/VP3 normalizovaný na poměr VP3/VP3 WT (1) činil u mutanty D10A 0,132. Na membráně je možné vidět i nespecifické proužky v oblasti okolo 75 kDa.

Abychom ověřili, že viriony D10A skutečně obsahují pouze nepatrné množství minoritního proteinu VP2, využili jsme vysoce citlivého barvení gelu SYPRO® Ruby Protein Gel Stain. Pro zajištění kvalitního rozdělení malých minoritních proteinů, jsme použili pro elektroforézu gradientový gel. Na gel jsme nanесли vzorky viru v objemech obsahujících stejná množství proteinů (koncentraci jsme změřili metodou Bredfordové, obrázek 22 – dolní panel). Na gelu je možné rozeznat proužky o mobilitě odpovídající histonům, virovým proteinům VP1, VP3 a VP2. Proteinu VP2 ve virionech mutanty D10A opět téměř chybí.

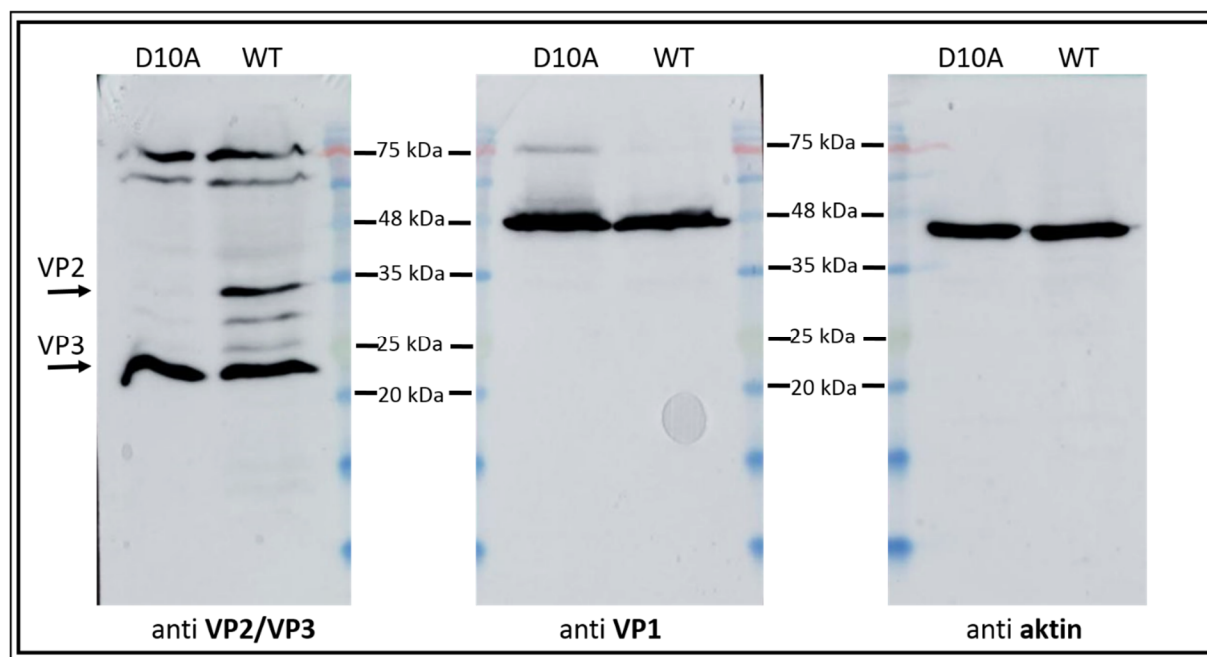


Obrázek 32: **Přítomnost virových strukturních proteinů ve virionech mutant.** Virová inokula byla smíchána s nanášecím pufrem, povařena a rozdělena elektroforeticky v 10% akrylamidovém gelu (SDS-PAGE, horní panel) nebo v gradientovém 4-12% akrylamidovém gelu (dolní panel). Gel byl obarven „SYPRO Ruby gel stain“ (dolní panel) nebo byl blotován pro analýzu metodou Western blot (horní panel). Membrány byly značeny protilátkou proti VP1 (vlevo) nebo protilátkou proti společné části VP2 a VP3 (vpravo).

6.3.2 MPyV D10A má sníženou produkci VP2

Nedostatek proteinu VP2 ve virionu může mít různé důvody. Problém může vznikat při skládání virionů, nebo u již při expresi na úrovni transkripce či translace. Rozhodli jsme se otestovat, zda je VP2 v buňkách produkován. Buňky 3T6 (9. pasáž) jsem transfekovali genomem MPyV D10A nebo MPyV WT. V čase 24 hodin po transfekci jsme buňky lyzovali a

přítomnost proteinu v buněčném lyzátu testovali proteinovou elektroforézou a a metodou Western blot (Obrázek 33). Pro kontrolu, že v buňkách došlo k přepnutí z produkce časných na pozdní transkripty a v buňkách jsou produkovány pozdní proteiny, byl protilátkou v lyzátu detekován protein VP1 (uprostřed). Jeho hladina byla podobná pro mutovaný i WT virus. Jako kontrolu, že během procesu nedošlo ke ztrátám a podařilo se nám zpracovat stejné množství buněčného materiálu pro D10A i WT jsme zvolili značení aktinu (vpravo). Při značení protilátkou proti společné části VP2 a VP3 jsme u WT i D10A našli proužek odpovídající velikosti VP3. Signál pro VP2 se nacházel pouze v lyzátu buněk transfekovaných divokým kmenem viru a nikoli v lyzátu buněk transfekovaných mutantou D10A (levý panel). V oblasti markeru pro 75 kDa jsme detekovali signál VP2/VP3, který jsme v naší laboratoři dříve určili jako buněčné proteiny nespecificky značené protilátkou (Forstova et al., 1993). V případě WT jsou také viditelné proužky nacházející se mezi VP2 a VP3, jedná se patrně o degradáty VP2.

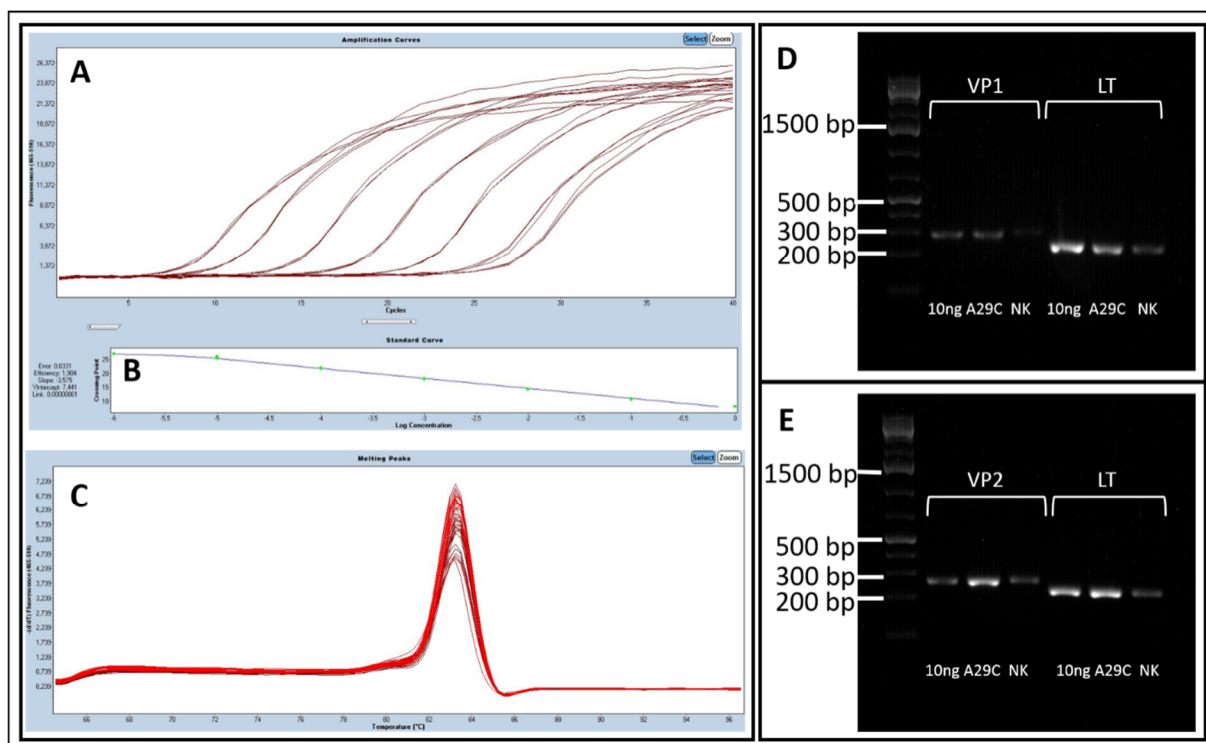


Obrázek 33: **Produkce virových strukturních proteinů v transfekovaných buňkách.** Kultura 3T6 byla zpracována 24 hodin po transfekci genomem MPyV WT a MPyV D10A. Buněčný lyzát (20 μ l levý a střední panel, 10 μ l pravý panel) byl elektroforeticky rozdělen v 15% akrylamidovém gelu (SDS-PAGE), přenesen na membránu metodou Western blot a označen protilátkami proti společné části minoritních proteinů VP2 a VP3 (levý panel), hlavnímu kapsidovému proteinu VP1 (střední panel) a aktinu (pravý panel).

6.4 Vliv provedených mutací VP2 na infektivitu viru

Zajímalo nás, jaký vliv má mutace E17A VP2 a mutace D10A na schopnost virionů infikovat permissivní buňky. Infikované buňky jsme detekovali metodou nepřímé imunofluorescence protilátkou proti LT antigenu. Infektivitu mutant jsme porovnávali s MPyV WT, který byl připraven po transfekci fibroblastů 3T6, tedy stejným způsobem jako obě mutanty. Infekce,

byla provedena stejným množstvím genomových ekvivalentů. Kvantifikaci genomových ekvivalentů ve virovém inokulu jsme určili izolováním DNA z virionů a analýzou pomocí metody real-time PCR. Pro analýzu jsme zvolili dva geny - LT a VP1 (použité primery viz 5.1.8). Analýza tání nicméně odhalila, že námi zvolené primery pro VP1 vytváří dva PCR produkty. Ačkoli jsme tento druhý produkt nenalezli vizualizací elektroforézou (Obrázek 34), zvolili jsme jako druhý gen VP2 místo VP1. Pro stanovení standartní křivky jsme použili ředící řadu plasmidu pMJG (Obrázek 34 vlevo). PCR reakce probíhali v triplikátech. Virovou DNA jsme testovali ve dvou ředěních. Výsledky jsou uvedeny v Tabulka 4. Abychom ověřili, že během experimentu nedošlo k významným ztrátám DNA, nebo jiným chybám, izolaci DNA z virionů a RT-PCR jsme zopakovali. Výsledky vykazovaly stejnou tendenci.

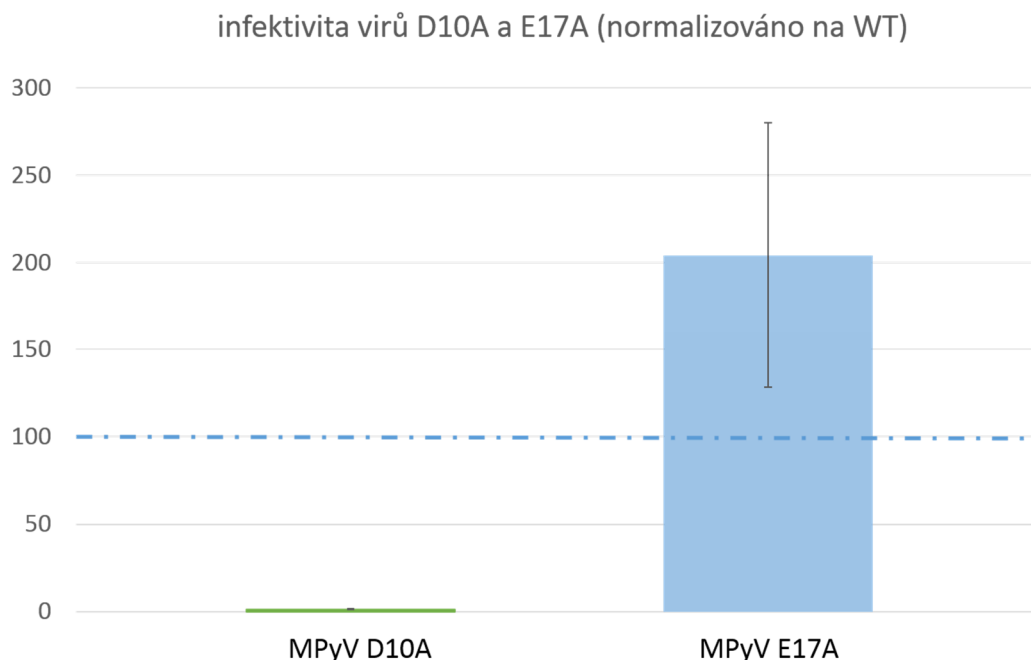


Obrázek 34: **Analýza virových genomů metodou Real-time PCR.** Izolovaná virová DNA a DNA pMJG o známé koncentraci byla použita jako templát pro RT-PCR s primery pro geny VP1, VP2 a LT. **A** – reprezentativní graf růstu fluorescence v závislosti na cyklech reakce ředící řady pMJG. **B** – hodnota Ct v závislosti na vstupní koncentraci DNA plasmidu pMJG, standartní křivka. **C** – reprezentativní graf analýzy tání při použití primerů LT, vyneseno pro všechny vzorky pMJG (temně červená) i virovou DNA (světle červená). **D** a **E** – elektroforéza produktů PCR reakcí v 1 % agarozovém gelu při použití primerů pro VP1, VP2 a LT. Prezentovány jsou vybrané vzorky: 10 ng – plasmidová DNA pMJG o koncentraci 10 ng/μl; A29C – DNA izolovaná z 10 μl virového inokula MPyV D10A ředěná 10x, NK – negativní kontrola. Více v kapitole 5.2.5.13

Primery pro LT				Primery pro VP2			
templát	ředění	ng/μl	průměr	templát	ředění	ng/μl	průměr
WT	1/10	0,631	0,694	WT	1/10	0,302	0,359
	1/50	0,757			1/50	0,417	
D10A	1/10	21,292	23,497	D10A	1/10	8,946	11,713
	1/50	25,701			1/50	14,479	
E17A	1/10	1,238	1,318	E17A	1/10	0,729	0,833
	1/50	1,398			1/50	0,937	

Tabulka 4: **Koncentrace virové DNA zjištěné metodou RT-PCR.** Koncentrace byly podle naměřené hodnoty Ct odečteny ze standartní křivky plasmidu pMJG. Uvedené jsou koncentrace po přepočtu ředění a po zprůměrování triplicátů daného vzorku.

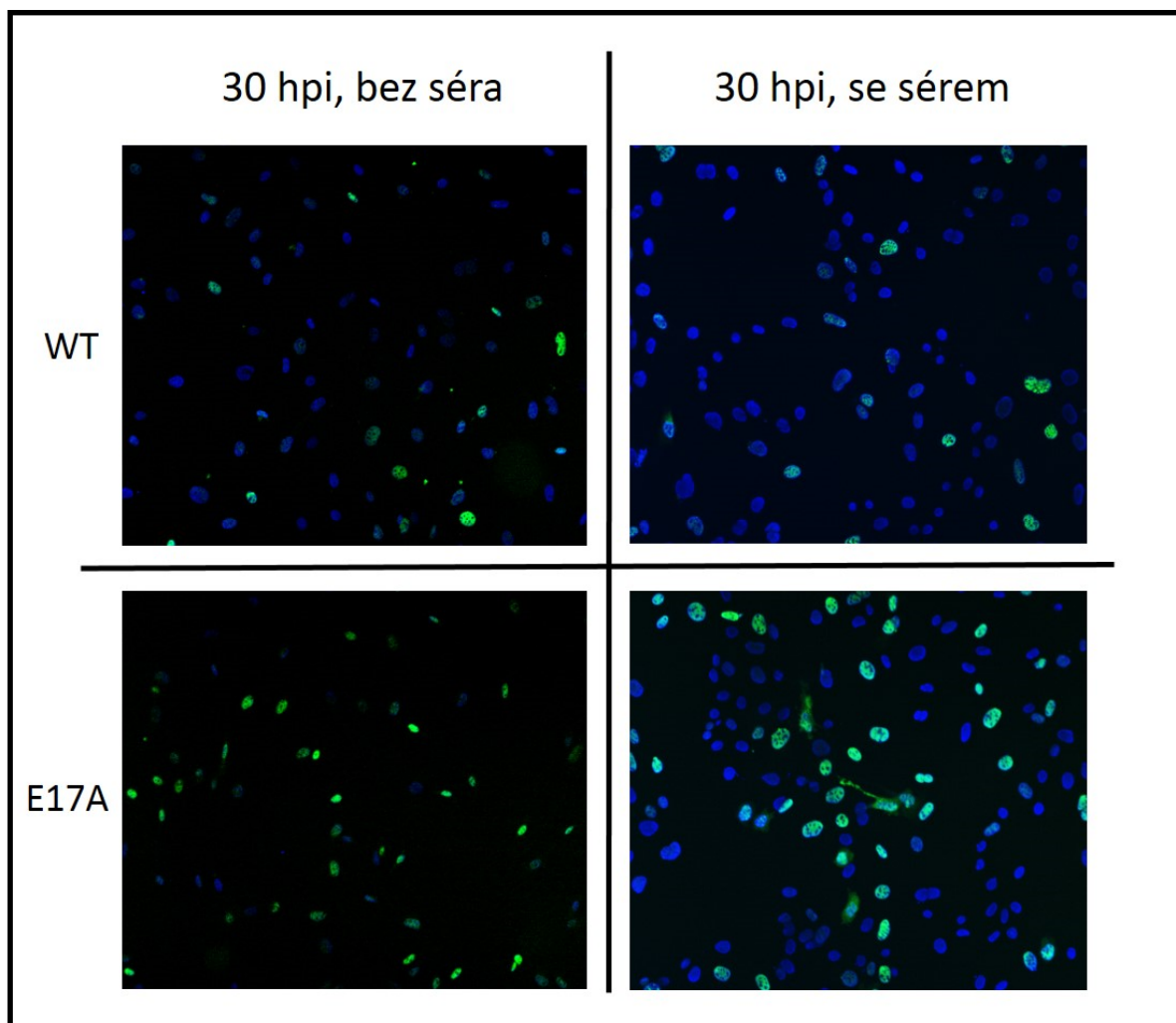
Přes noc narostlé buňky 3T6 na mikroskopických sklíčkách jsme infikovali viry WT, D10A a E17A množstvím obsahující stejné množství genomových ekvivalentů nebo médiem bez virů (NK). Dvacet čtyři hodin po infekci jsme buňky fixovali a označili v nich LT antigen. Pro každý vzorek jsme spočítali počet buněk produkující LT a počet všech buněk ve 40 zorných polích (zvětšení 200x, odpovídá 1480–3460 buňkám). Provedli jsme tři biologická opakování). Výsledky normalizované na WT jsou uvedena v Graf 4.



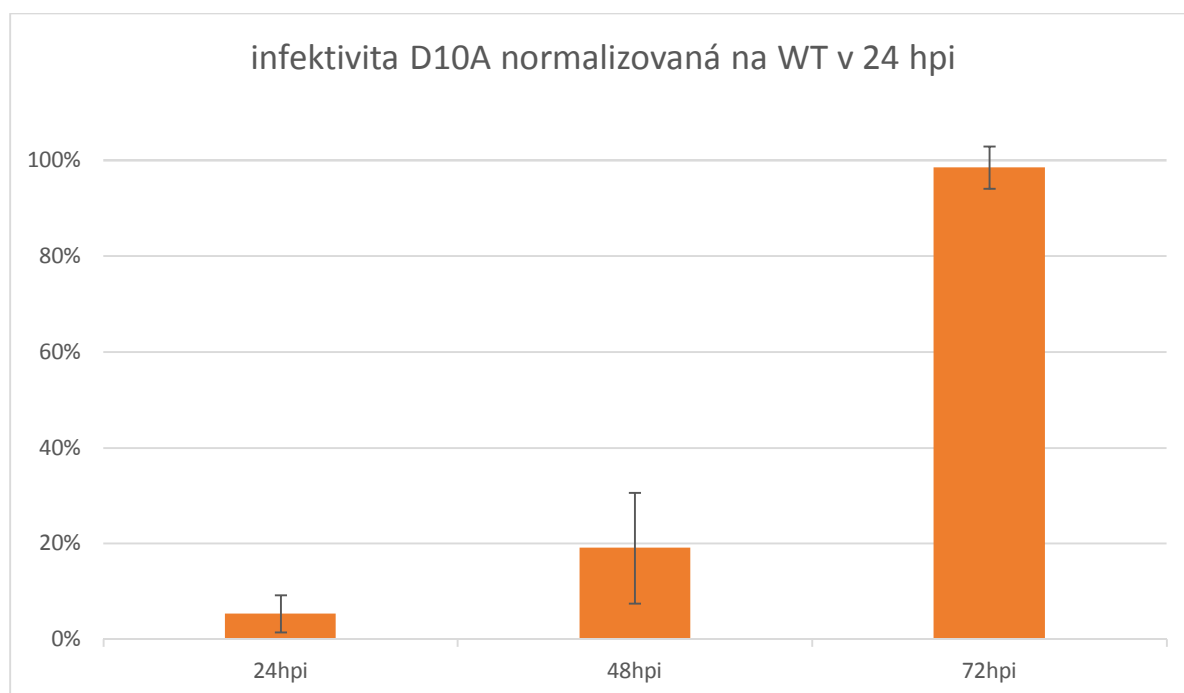
Graf 4: **Infektivita virů MPyV D10A a MPyV E17A.** Kultura 3T6 narostlá na mikroskopickém sklíčku byla infikována buď MPyV WT, nebo MPyV D10A anebo MPyV E17A stejným množstvím genomových ekvivalentů. Po 24 hodinách byly buňky fixovány a imunofluorescenčně označeny protilátkou proti LT. Prezentováno je procento LT pozitivních buněk infikovaných virem D10A a E17A normalizované na množství LT pozitivních buněk při infekci MPyV WT (100%; přerušovaná čára). Chybové úsečky jsou směrodatné odchylky ze tří opakování.

Mutanta D10A byla téměř neinfekční, dosahoval průměrně 1,4% infekitivity WT. Mutanta E17A měla velký rozptyl infekitivity v závislosti na použité pasáži buněk. Její infektivita se pohybovala od hodnot podobných jako u WT (116%) až po hodnoty třikrát vyšší (301%). Rozdíl v počtu LT pozitivních buněk infikovaných WT a D10A byl signifikantní ($p=0.0384$). Rozdíl mezi WT a mutantou E17A signifikantní nebyl ($p=0,2774$). Experiment s E17A a WT jsme zopakovali ještě jednou, tentokrát jsme buňky fixovali až po 30 hodinách, kdy je exprese LT stabilnější. Rovněž jsme udělali paralelní experiment s buňkami kultivovanými v médiu bez séra, abychom zabránili jejich případnému nerovnoměrnému růstu (Obrázek 35). V obou případech bylo více LT pozitivních buněk v kultuře infikované mutantou E17A než virem divokého typu. Kvantifikace buněk (40 zorných polí, 1985-2406 buněk) kultivovaných v médiu se sérem ukázala trojnásobně vyšší množství LT pozitivních buněk v kultuře infikované MPyV E17A než v kultuře infikované MPyV WT.

Dále jsme se zaměřili na schopnost viru MPyV D10A infikovat buňky. Buňky jsme infikovali stejným množstvím genomových ekvivalentů viru MPyV WT a MPyV D10A nebo médiem (NK) a vzorky odebírali po 24, 48 a 72 hodinách. Experiment jsme provedli ve dvou nezávislých opakováních. Pro každý vzorek jsme spočítali buňky pozitivní na LT ve 40 zorných polích (až 178 buněk pozitivních na LT). Zatímco množství LT pozitivních buněk infikovaných WT každých den strmě stoupalo, množství buněk produkující LT infikovaných D10A zůstávalo po celou dobu velmi nízké, nikoli však neměnné. Množství LT pozitivních buněk infikovaných D10A se 72 hpi téměř vyrovnalo počtu LT pozitivních buněk infikovaných WT 24 hpi (Graf 5). Mutanta MPyV D10A není zcela neinfekční, její infektivita je ale zpomalená o 48 hodin.



Obrázek 35: Srovnání množství LT pozitivních buněk infikovaných MPyV E17A a MPyV WT 30 hpi. Kultura 3T6 narostlá na mikroskopickém sklíčku za přítomnosti séra (pravá část) nebo bez séra (levá část) byla infikována virovým inokulem MPyV WT (horní část) a MPyV E17A (spodní část) se stejným množstvím genomových ekvivalentů. Po 30 hodinách byly buňky fixovány a imuno fluorescenčně označeny protilátkou proti LT. Prezentovány jsou reprezentativní snímky pořízené při zvětšení 100x.



Graf 5: **Infekce MpyV D10A je opožděná.** Kultura 3T6 narostlá na mikroskopickém sklíčku byla infikována virovým inokulem MPyV WT a MPyV D10A se stejným množstvím genomových ekvivalentů. Po 24, 48 a 72 hodinách byly buňky fixovány a imunofluorescenčně označeny protilátkou proti LT. Prezentován je počet LT pozitivních buněk infikovaných MPyV D10A v 24, 48 a 72 hodin normalizovaný na počet LT pozitivních buněk infikovaných MPyV WT 24 hpi (100 % představuje počet LT pozitivních buněk infikovaných WT 24 hpi). Chybové úsečky jsou směrodatné odchylky ze dvou opakování.

6.5 Produkce myšího polyomaviru s mutovaným jaderným lokalizačním signálem.

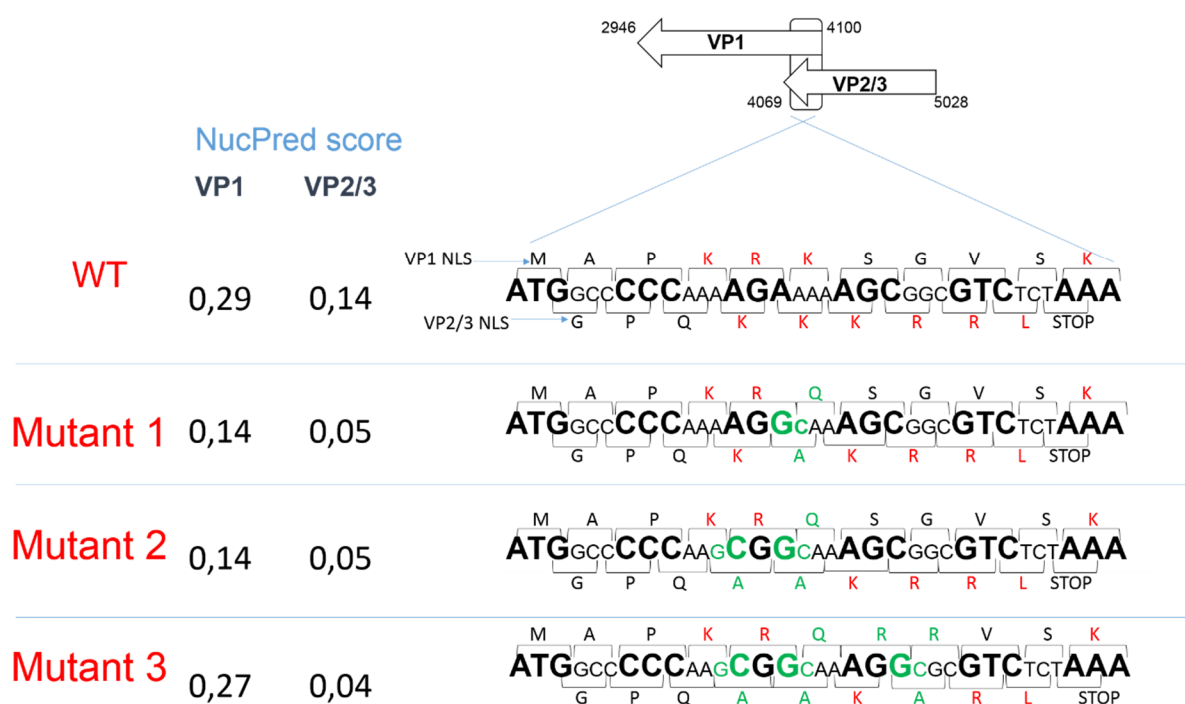
Během infekce je virus dopraven váčkovým transportem do endoplasmatického retikula. Řada pozorování procesů spojených s pobytem viru v ER nasvědčuje tomu, že z ER část virionů uniká do cytosolu. Nejpravděpodobnějším transportem z cytosolu do jádra je transport přes jaderný pór zprostředkovaný importiny (kapitola 3.3.4). Abychom mohli otestovat, zda viriony využívají při transportu do jádra importiny a abychom mohli zjistit, jakou roli v transportu do jádra mají NLS sekvence kapsidových proteinů, navrhli jsme, mimo jiné, sérii virů mutovaných v jaderných lokalizačních signálech kapsidových proteinů. Během své práce jsem připravila jeden z nich.

6.5.1 Mutageneze jaderného lokalizačního signálu strukturních proteinů

Jaderné lokalizační signály kapsidových proteinů jsou kódovány v oblasti, kde dochází k překryvu otevřeného čtecího rámce pro minoritní kapsidové proteiny a pro VP1. Minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3 mají NLS na C-konci, VP1 má NLS na N-konci. Konsensus jaderného lokalizačního signálu obsahuje kladně nabitě aminokyseliny lysiny a argininy. Navrhli jsme substituce těchto aminokyselin za neutrální alanin nebo za glutamin. Navržené

mutanty měly substituované jednu, dvě, nebo tři kladně nabitě aminokyseliny v NLS minoritních proteinů. Dvě z těchto mutant měly zároveň substituci jedné bazické aminokyseliny NLS proteinu VP1. Třetí mutanta byla navržena tak, aby měla nahrazené tři bazické aminokyseliny v NLS minoritních proteinů a zároveň získala jednu novou bazickou aminokyselinu v sekvenci NLS na N konci proteinu VP1 (Obrázek 36). Tato mutanta by tedy měla mít funkční NLS proteinu VP1 a nefunkční NLS minoritních kapsidových proteinů.

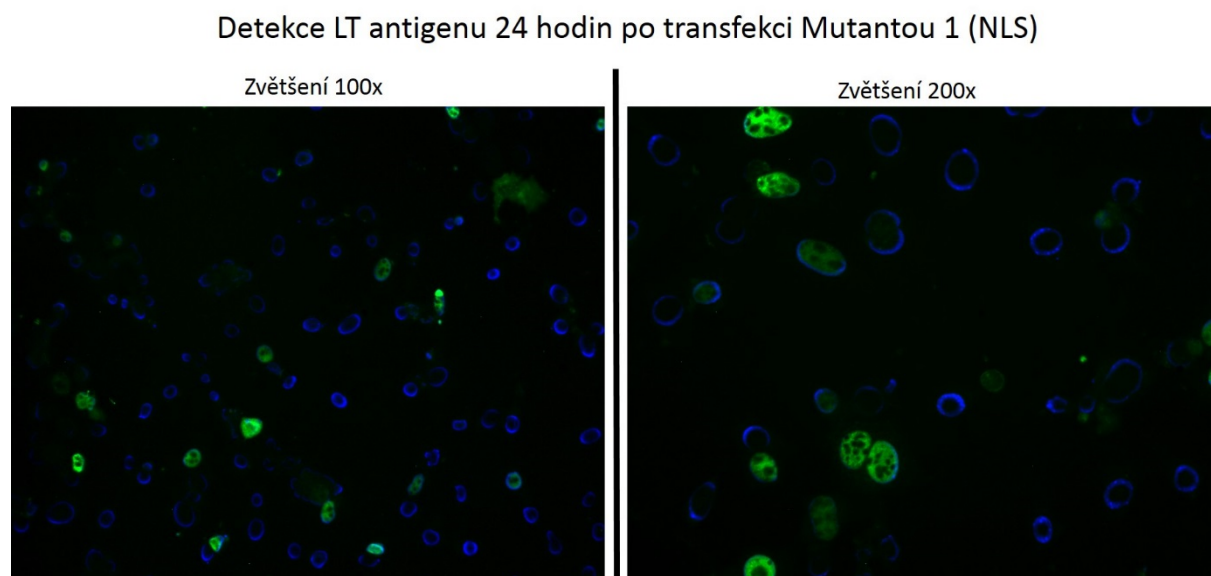
V této práci se budu zabývat první mutantou (mutanta 1). Ta má substituci aminokyseliny v sekvenci NLS minoritních proteinů (K315A) a zároveň jedné aminokyseliny v oblasti NLS proteinu VP1 (K6Q). Pro všechny navržené sekvenční změny jsme pomocí programu NucPred vypočetli predikovanou sílu NLS signálu (Obrázek 36). U mutanty 1 by mělo dojít ke snížení síly NLS signálu jak u proteinu VP1, tak minoritních proteinů.



Obrázek 36: **Navržené změny sekvence jaderného lokalizačního signálu.** Otevřený čtecí rámec pro proteiny VP2/VP3 a VP1 se překrývá (horní obrázek). Velkými písmeny je vždy uvedena nukleotidová sekvence. V horní řádce je uvedena aminokyselinová sekvence proteinu VP1, ve spodním řádku je sekvence pro protein VP2/3. Aminokyselinová sekvence NLS je uvedena červeně, zeleně jsou zvýrazněny zavedené změny. U každé mutanty je uvedeno skóre předpověděné NLS programem NucPred.

Substituci navrženou pro mutantu 1 jsme zavedli do plasmidu pMJG, který nese celý genom MPyV. Mutagenzi jsme provedli systémem „GENEART® Site-Directed Mutagenesis System“ způsobem popsáným v předchozích kapitolách (6.2). Použité primery pro Mutantu 1 jsou uvedeny v kapitole (5.1.8). Plasmidem jsme transformovali kompetentní bakterie E.Coli

DH5alfa-T1R a kultivovali je na selekčních ampicilinových miskách. Vybrali jsme několik kolonií, které jsme dále pěstovali v tekutém LB médium. Z těchto kolonií jsme izolovali plasmidovou DNA. Správnost mutace jsme potvrdili sekvenováním s použitím primeru „VP2 NLS“. Vybrali jsme jednu z kolonií, která nesla požadovanou mutaci a namnožili ji do velkého objemu. Maxipreparací komerčním kitem jsme izolovali plasmid, tak aby neobsahoval bakteriální endotoxiny. Z plasmidu jsme vyštěpili genomovou DNA enzymem EcoRI a provedli jsme ligaci ve velkém objemu. DNA jsme z velkého objemu přesráželi. Plasmidem jsme transfekovali myší fibroblasty 3T6. Provedli jsme 6 nukleofekčních reakcí. Transfekované buňky zůstaly dále kultivovány v DMEM médiu. Část buněk jsme vyseli na mikroskopická sklíčka a po 24 hodinách jsme v nich imuno fluorescenčně detekovali LT antigen, abychom zkontrolovali úspěšnost transfekce. Z Obrázek 37 je patrné, že část buněk byla úspěšně transfekována a produkovala LT antigen.



Obrázek 37: **Kontrola transfekce po 24 hodinách.** Myší fibroblasty 3T6 transfekované genomem Mutanty 1 jsou 24 hpi imuno fluorescenčně značeny protilátkou proti LT antigen (zelená). Jádra jsou značena DAPI (modrá). Prezentovány jsou snímky ve dvou odlišných zvětšeních.

Po 6 dnech kultivace transfekovaných buněk jsme izolovaly virus. Izolace probíhala stejně jako v předchozích případech. Získaný roztok média a buněčného extraktu jsme přečistili centrifugací přes sacharozový polštář. Pelet jsme rozpustili ve filtrovaném pufru B a rozdělili ho izopyknickou centrifugací v gradientu chloridu cesného do frakcí. V Tabulka 5 jsou uvedeny naměřené refraktometrické indexy získaných frakcí. Frakce z obou gradientů byly rozděleny do společných frakcí F1, F2 a F3 a dialyzovány proti B pufru. Nakonec byl virus zkoncentrován ultracentrifugací přes sacharózový polštář.

	Mutanta 1 (NLS)	
	Gradient 1 -(η)	Gradient 2-(η)
F1	1,334	1,37
	1,3485	1,376
	1,374	1,374
	1,375	1,372
	1,373	1,37
	1,371	1,369
	1,3695	1,368
	1,368	
F2	1,367	1,367
	1,3665	1,366
	1,366	1,366
	1,365	1,365
	1,365	1,365
	1,364	1,364
	1,364	1,364
	1,3635	1,363
	1,363	
F3	1,3625	1,3625
	1,362	1,362
	1,361	1,362
	1,36	1,361
	1,359	1,3595
		1,3585

Tabulka 5: **Gradientová izolace viru „mutanta 1 (NLS)“ - refraktometrické indexy a rozdělení do frakcí.** Gradienty chloridu cesného byly rozebrány do frakcí o objemu přibližně 0,5 ml. U jednotlivých vzorků byl změřen refraktometrický index uvedený v tabulce. V tabulce je graficky znázorněno jejich následné spojení do frakce 1 (F1), frakce 2 (F2) a frakce 3 (F3).

6.5.2 Charakterizace virionů mutovaných v jaderném lokalizačním signálu.

Získané frakce jsme analyzovali elektronovou mikroskopií. Reprezentativní snímky jsou uvedeny na Obrázek 38. První frakce obsahovala volné pentamery a malé množství virionů. V druhé frakci jsme pozorovali až na výjimky pouze plné viriony. Třetí frakce obsahovala velké množství nečistot, prázdné partikule a trubicovité útvary. Takovéto útvary jsou v preparacích

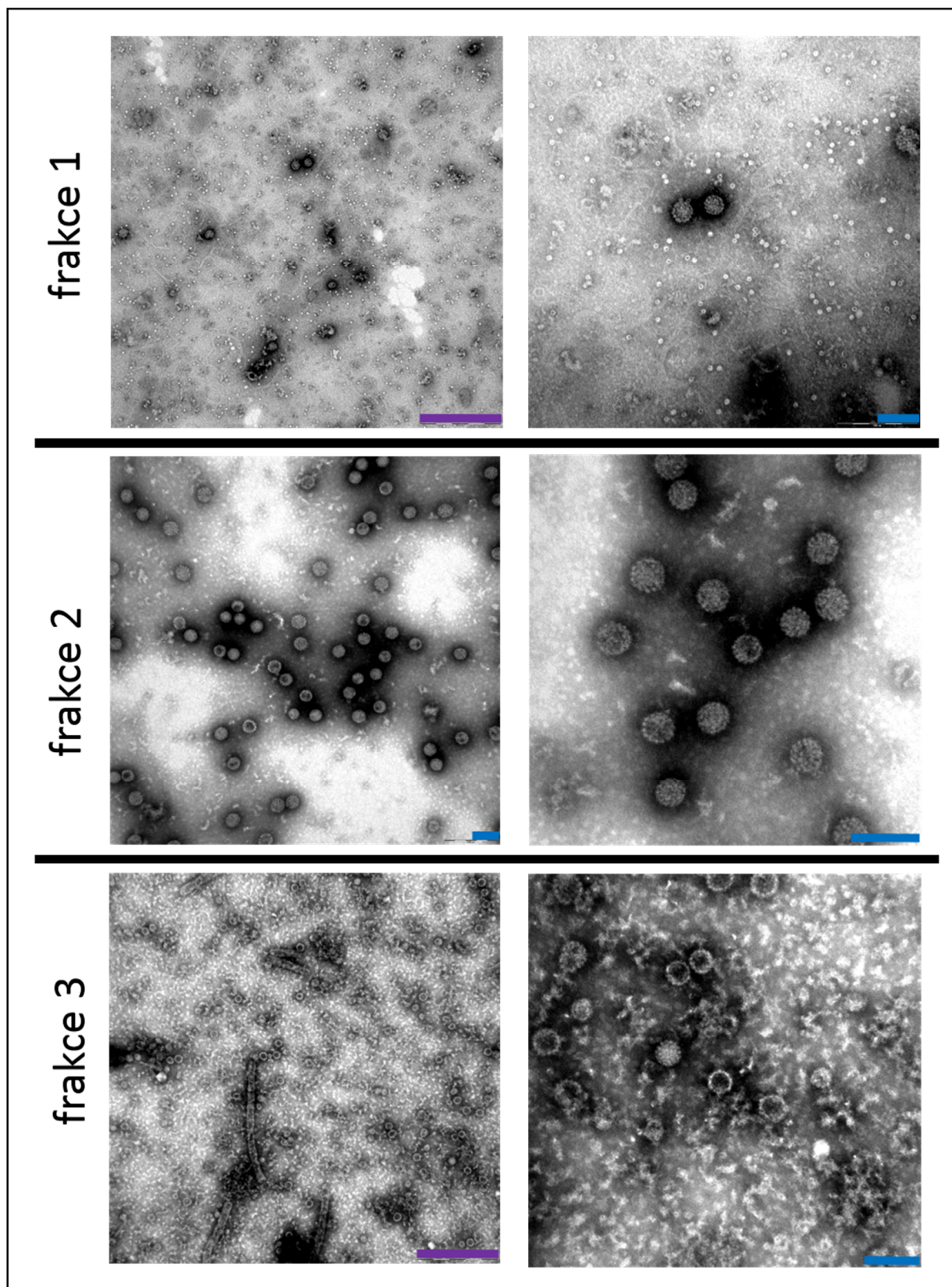
MPyV pozorovány běžně. Jedná se o polymery tvořené virovými proteiny. U všech tří frakcí jsme otestovali hemaglutinační titr (Tabulka 6)

Mutanta 1 (NLS)	Frakce 1	Frakce 2	Frakce 3	WT – pozitivní kontrola	NK
Titr/ml	5×10^{10}	$3,3 \times 10^{12}$	$6,5 \times 10^{12}$	$3,3 \times 10^{12}$	0

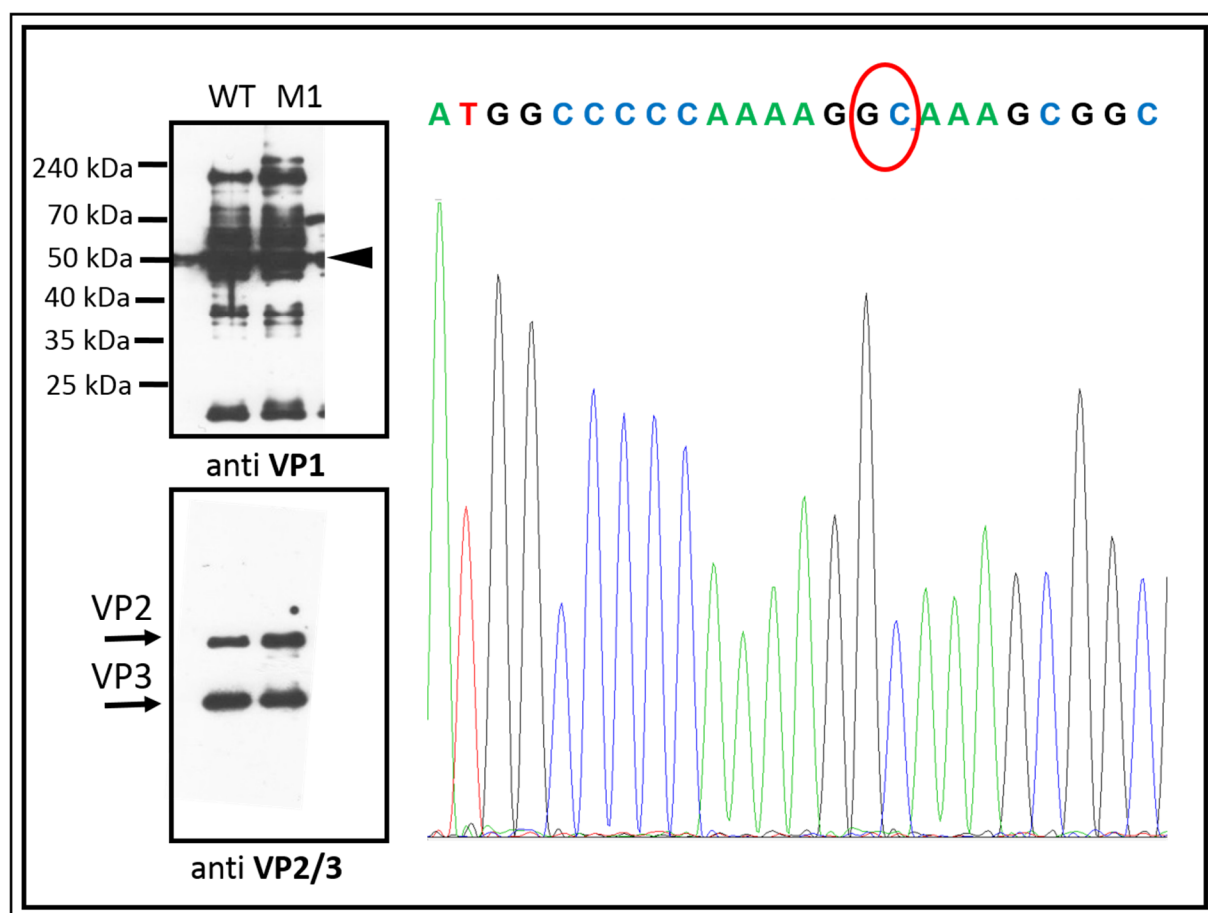
Tabulka 6: **Hemaglutinační titr virového izolátu Mutanta 1 (NLS)**. U jednotlivé virových frakcí byla testována schopnost aglutinovat morčecí červené krvinky. Z odečtených výsledků byl vypočítán hemaglutinační titr. Jako pozitivní kontrola bylo použito inokulum WT MPyV F2. Jako negativní kontrola byl použit pufr B.

Dále jsme testovali přítomnost všech tří strukturních proteinů ve virionech Mutanty 1 metodou „Western blot“ (Obrázek 39, vlevo). Jako kontrolu jsme použili nemutovaný virus. Pro analýzu byl použit objem virových inokul odpovídající 20 µg celkových proteinů. Koncentrace proteinů byla určena pomocí přístroje Qubit. Proteiny rozdělené elektroforeticky a přenesené na membránu byly označeny buď protilátkou proti VP1, nebo protilátkou proti společné části VP2/VP3. Protilátka proti VP1 označila proužek velikostí odpovídající monomeru proteinu VP1 a zároveň i sérii dalších proužků. Tyto další proužky představují dimery, oligomery a degradační produkty. Protilátka proti společné části VP2 a VP3 označila dva proužky s odlišnou migrační rychlostí, které reprezentují protein VP2 a VP3.

Z virionů jsme izolovali DNA abychom sekvenováním ověřili přítomnost zavedené mutace. Z Obrázek 39 vpravo je patrné, že nedošlo ke vzniku a propagaci revertantů.



Obrázek 38: Snímky izolátů viru Mutanta 1 (NLS)“ z elektronového mikroskopu. Negativní barvení. Kontrast byl zajištěn metodou negativního barvení (PTA). Pro každou frakci je uveden snímek pro dvě odlišná zvětšení. Modrá úsečka odpovídá 100 nm a fialová 500 nm.



Obrázek 39: **Charakterizace virionů MPyV mutovaného v NLS (Mutanta 1) metodou Western blot.** Vlevo: Proteiny virionů (20 μ g) byly rozděleny elektroforeticky v 10% akrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Proteiny byly přeneseny na membránu. Membrány byly značeny protilátkou proti VP1 (horní panel) nebo protilátkou proti společné části VP2 a VP3 (dolní panel). WT: nemutovaný MPyV, M1 – mutanta 1 (NLS), černý trojúhelník označuje monomer VP1. Vpravo: Chromatograf sekvenční DNA Mutanta 1. DNA byla izolována z virionů. Červeně jsou zakroužkované substituované nukleotidy.

Ověřili jsme, že Mutanta 1 tvoří viriony složené ze všech kapsidových proteinů a že nese námi požadovanou změnu nukleotidové sekvence. Tento virus byl použit pro řadu experimentů testujících roli NLS signálu kapsidových proteinů. Ty jsou zpracovány v pracovní verzi manuskriptu připravovaného pro publikaci.

7 Diskuze

Myší polyomavirus je neobalený virus vstupující do buňky receptorem zprostředkovanou endocytózou a replikující se v buněčném jádře. V cytoplasmě se pohybuje endozomálními vesikly přes časné a pozdní endosomy do ER. Aby mohl doručit genom do jádra, musí z ER uniknout. Mechanismus úniku z ER není zatím zcela objasněn. Nicméně, řada studií podporuje model, podle kterého se na úniku virionů z ER do cytosolu podílejí minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3. Proteiny VP2 a VP3 mají hydrofobní charakter (kapitoly 3.2.1 a 3.3.2). Bylo ukázáno, že viriony jsou v ER rozvolňovány a VP2 a VP3 se dostávají na povrch rozvolněných částic. Mohou tak interagovat s membránou ER, čímž umožňují uvolnění virionů do cytosolu (Huérffano et al., 2017, Geiger et al., 2011). Výzkumy provedené na viru SV40 ukazují, že kromě vazby virionů do membrány zprostředkované minoritními kapsidovými proteiny je pro účinnou infekci důležité klastrování virionů s proteiny ERAD dráhy a s proteiny asociovanými s translokou. Bylo také popsáno, že u SV40 se kromě hydrofobních domén VP2 a VP3 hraje roli v úniku virionů z ER záporně nabitá kyselina glutamová v pozici 17 na N-konci proteinu VP2 (Geiger et al., 2011). Jelikož nabité aminokyseliny v hydrofobním kontextu slouží jako signál pro transport translokou a pro degradaci (Bonifacino et al., 1991). Geiger et al. předpokládají, že viriony prostřednictvím aminokyseliny E17 interagují s translokou (Geiger et al., 2011). Proto, abychom mohli lépe porozumět roli translokou a proteinů ERAD dráhy v úniku virionů MPyV z ER, rozhodli jsme se s použitím konfokální mikroskopie a „proximity ligation assay“ studovat interakce MPyV s proteiny asociovanými s translokou a ERAD dráhou (DNAJ B14, BiP, BAP31). Zároveň jsme vytvořili mutované viry se substitucí jedné ze dvou N koncových záporně nabitých aminokyselin proteinu VP2, abychom mohli určit roli těchto aminokyselin na efektivitu MPyV a dále studovat případnou interakci s ERAD proteiny a cílení virionů do translokou.

Pro produktivní infekci musí po úniku virionu z ER následovat transport virového genomu do jádra. Některé studie ukazují, že polyomaviry využívají transportu přes jaderné póry za účasti importinů (Qu et al., 2004, Bennett et al., 2015). Abychom mohli studovat transport MPyV do jádra rozhodli jsme se vytvořit mutanty v NLS strukturních proteinů.

7.1 Sledování lokalizace DNAJ B14 a VP1 v buňce během infekce myším polyomavirem

V průběhu infekce SV40 dochází k shlukování hostitelských transmembránových proteinů endoplasmatického retikula asociovaných s ER retrotranslokou a ERAD dráhou. Vznik těchto shluků („foci“) lze v buňce pozorovat pomocí fluorescenční mikroskopie. Do těchto shluků se koncentrují proteiny BAP31, DNAJ B12, DNAJ B14, DNAJ C18 a kolokalizují zde

s virovým kapsidovým proteinem VP1. Snížení produkce těchto hostitelských proteinů v buňkách vede k omezení translokace virionů do cytosolu a ke snížené infektivitě (Goodwin et al., 2011, Walczak et al., 2014, Bagchi et al., 2015, Geiger et al., 2011, Inoue et al., 2015).

Nás zajímalo, zda bude DNAJ B14 reagovat změnou své lokalizace také na infekci MPyV. Ukázali jsme, že infekce myších fibroblastů 3T6 MPyV je doprovázena změnou lokalizace DNAJ B14, vedoucí k shlukování do „foci“, ve kterých kolokalizuje s virovou VP1 (Obrázek 12 Obrázek 13). To, že se virový VP1 dostává do bezprostřední blízkosti DNAJ B14, jsme prokázali pomocí „proximity ligation assay“ (Obrázek 15). Stejně tak jsme pozorovali odlišnou velikost, tvar i různý počet foci v infikovaných buňkách. Toto pozorování je v souladu s prací Walczaka a jeho kolegů, kteří při infekci SV40 rovněž zaznamenali heterogenitu ve výskytu „foci“ v buňkách (Walczak et al., 2014).

Největší počet „foci“ DNAJ B14 se vyskytoval v buňkách pět hodin po infekci, v tuto dobu také dosahovali „foci“ největší velikosti, potom jejich počet ubýval (Graf 1 a Graf 2). Tyto výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými studiemi, které se zabývali průběhem transportu virionu buňkou během časně infekce. Největší kolokalizace virionů s BiP (marker ER), je 3-4 hodiny po infekci. Během páté a šesté hodiny výskyt MPyV v ER klesá (Gilbert and Benjamin, 2004, Mannová and Forstová, 2003). Čtyři hodiny po infekci MPyV kolokalizuje s membránovými ER proteiny derliny (Lilley et al., 2006). Můžeme předpokládat, že čtyři hodiny po infekci dochází k interakci virionů s membránou prostřednictvím minoritních proteinů. Virová DNA vstupuje do jádra přibližně v šest hodin po infekci, jelikož produkci LT antigenu je možné detekovat již v 8 hodin po infekci (nepublikované výsledky). *In situ* hybridizace virových genomů ukázala počínající replikaci virové DNA v jádře 10 hpi (Mannová a Forstová, 2003)

K největší akumulaci „foci“ tedy dochází v době mezi zanořením virionu do membrány ER a transportem do jádra, tedy v době, kdy bychom očekávali únik virionů z ER. K snížení výskytu „foci“ během šesté a sedmé hodiny dochází pravděpodobně kvůli úbytku virionů asociovaných s membránou, u kterých došlo k uvolnění do cytosolu.

Jak bylo zmíněno, po páté hodině po infekci klesá průměrné množství a průměrná velikost kolokalizací DNAJ B14 a VP1 (Graf 1 a Graf 2). Ačkoli klesá celkový výskyt a velikost „foci“, některé zůstávají v buňkách přítomné i v pozdějších časech (Graf 3). Něco podobného bylo pozorováno i v případě SV40. Při infekci SV40 se množství buněk, které obsahují alespoň jedno „foci“ BAP31, DNAJ B12 nebo DNAJ B14 zvyšovalo až do šestnácté hodiny po infekci, kdy

byl experiment ukončen (transport SV40 je pomalejší, do cytosolu se přesouvá v 6-8 hpi) (Walczak et al., 2014). Předchozí výzkumy SV40 ukázaly, že výskyt „foci“ souvisí s úspěšností úniku virionů z ER do cytosolu. Pokud je snížena exprese některého z hostitelských faktorů ER například Hsp105, Hsc70 a SGTA, které se podílí na translokaci SV40 z ER do cytosolu, četnost „foci“ vizualizovaných pomocí BAP31 se zvýší. Zároveň se sníží množství viru v cytoplasmě a produkce virového LT (Ravindran et al., 2015, Dupzyk et al., 2017). Pokud je Hsp105 „nadprodukován, výskyt shluků BAP31 se naopak zmenší (Ravindran et al., 2015). Podobný vliv na výskyt těchto „foci“ mají i proteiny PDI a ERdj5, které se podílejí na částečném rozvolňování virionu v ER (Inoue et al., 2015). Domníváme se, že „foci“, pozorované v pozdějších časech infekce (7 hpi a dále) obsahují nejspíše viriony, u kterých selhaly mechanismy úniku z ER a které se v těchto místech akumulují. Také se ale může jednat o viriony, které byly do ER transportovány později. Nicméně, již dříve bylo publikováno, že pouze zlomek virionů, které vstupují do buňky je doručen do jádra. Zbytek VP1 a virové DNA zůstává shromážděn v cytoplasmě v okolí jádra a po několika dalších hodinách virová DNA i kapsidové proteiny z těchto oblastí mizí (Mannová a Forstová, 2003).

Je tedy možné, že viriony MPyV, které infikují buňku opouštějí za asistence ERAD proteinů endoplasmatické retikulum kolem páté hodiny po infekci. Subpopulace virionů, které se z různých důvodů únik nepodaří se akumuluje v ER s ERAD proteiny. Jaký je přesně jejich další osud není známo. Je možné, že po delší době inkubace s lumenálními ER enzymy (proteiny rodiny PDI), dojde k rozpadu virionů, který dovolí jejich zpracování jako ERAD substrátu, translokaci přes retrotranslokon do cytosolu a další degradaci v proteazomu.

To, že při infekce MPyV dochází k shlukování DNAJ B14 a že se VP1 dostává do bezprostřední blízkosti tohoto hostitelského proteinu naznačuje, že je možné, že MPyV interaguje v membráně ER se stejným nebo podobným komplexem jako SV40. SV40 se váže na BAP31 a laterálně interaguje s DNAJ B14 a dalšími hostitelskými proteiny (kapitola 3.3.2.3). Pokud MPyV využívá k úniku z ER stejného mechanismu jako SV40, pak by měl indukovat tvorbu BAP31 „foci“. Již dříve bylo ukázáno, že při potlačení hladiny mRNA (knock down) pro BAP31 dochází k výraznému snížení počtu buněk infikovaných MPyV. V závislosti na typu buněk a úspěšnosti snížení produkce BAP31 bylo množství LT pozitivních buněk sníženo na 8,9 – 16% (Geiger et al., 2011, Primi Blake, 2012). Změny v produkci BAP31 měly ze všech testovaných ER proteinů, mezi nimiž byly DANJB12, B14, C18 a derliny, největší vliv na infektivitu MPyV (Primi Blake, 2012, studentská práce). Z těchto důvodů nás změny v jeho lokalizaci v infikovaných buňkách zajímaly. Bohužel, komerční protilátka, kterou jsme pro tuto

analýzu používali, byla nespecifická. Abychom mohli potvrdit, že se BAP31 nachází v MPyV indukovaných „foci“ budeme muset tento experiment zopakovat s novou protilátkou, nebo zvolit jinou metodu. Dále bychom také chtěli otestovat, zda infekce MPyV indukuje shlukování dalších ERAD membránových proteinů jako je DNAJ B12 či DNAJ C18.

Takovéto shromažďování proteinů v určité oblasti ER pravděpodobně vyžaduje nějaký druh signalizace. Je možné, že poté, co dojde k částečnému rozvolnění kapsidy a exponování hydrofobních domén, jsou tyto části proteinů v lumen ER zaměněny hostitelským aparátem za špatně složené proteiny, což může vést k signalizaci a klastrování ERAD mašinérie. Další možností je, že je virion rozeznáván až po zanoření do membrány, kde interaguje s membránovými ERAD proteiny, což vede k jejich shlukování. Zatím je známo, že SV40 postrádající protein VP3 není schopen indukovat shlukování BAP31 a kochaperonu DNAJ C18 (Bagchi et al., 2015). Při snížení produkce PDI a ERdj5, které se účastní rozvolňování kapsidy, dochází ke snížení interakce virionu s BAP31. Zároveň ale dochází ke zvětšování se a k většímu výskytu shluků ve kterých kolokalizuje BAP31 s VP1. Tedy tvorba „foci“ je indukovaná přes nějakého prostředníka ještě předtím, než virion interaguje v membráně s BAP31 (Inoue et al., 2015). DNAJ C18 podporuje shlukování dalších proteinů včetně DNAJ B14 a BAP31 (Bagchi et al., 2015). Zda je DNAJ C18 prvním senzorem virionu v ER, který indukuje shlukování ostatních membránových proteinů není známo.

Jak bylo detailně popsáno v literárním přehledu, chaperon BiP je další z buněčných faktorů, který se podílí na infekci viru SV40 (Geiger et al., 2011). Ukázali jsme, že při infekci myších fibroblastů 3T6 dochází ke kolokalizaci MPyV VP1 s BiP (Obrázek 16). To je ve shodě s dřívějšími publikacemi (Gilbert and Benjamin, 2004, Mannová and Forstová, 2003). Kolokalizace VP1 a BiP byla zaznamenána nejen konfokální mikroskopií buněk s fluorescenčně značenými proteiny, ale bezprostřední blízkost (do 40 nm) obou proteinů jsme prokázali 5 hpi metodou „Proximity Ligation Assay“ (Obrázek 17). Je tedy vysoce pravděpodobné že BiP s viriony MPyV interaguje. Dříve již byla ukázána vazba BiP na virus SV40 (Inoue a Tsai, 2015). V našem pokusu kolokalizoval VP1 MPyV s BiP 4 i 6 hpi. Jak bylo zmíněno výše, experimenty jiných autorů testující výskyt MPyV v ER během infekce ukázali, že šest hodin po infekci výrazně ubývá kolokalizace mezi viriony a BiP (Gilbert and Benjamin, 2004, Mannová and Forstová, 2003). V našem pokusu jsme buňky infikovali s vysokou multiplicitou, zatímco v experimentu Gilbertové se v ER jedné buňky nachází maximálně 20 virionů. Domníváme se, že při takto vysoké multiplicitě je rozdíl těžko rozeznatelný, protože

pouze relativně malá frakce virionů opouští ER, což vyplývá i z výsledků sledování výskytu kolokalizace DNAJ B14 s VP1.

7.2 Produkce a charakterizace virionů MPyV mutovaných v záporně nabitých aminokyselinách D10 a E17 na N konci VP2.

Přenos virionů do cytosolu zajišťují minoritní proteiny, které se prostřednictvím hydrofobních domén zanořují do membrány. Abychom mohli dále studovat roli minoritních proteinů v interakci s proteiny asociovanými s translokem, rozhodli jsme se připravit viry mutované v nabitých aminokyselinách N-konce minoritního proteinu VP2. To proto, že nabité aminokyseliny by mohly sloužit jako signál pro translok a ERAD (jak bylo navrženo (Geiger et al., 2011)). U viru SV40 je pro úspěšnou infekci důležité, aby byl v pozici 17 zachován náboj, nejspíše kvůli interakci s BAP31. Dvě záporně nabitě aminokyseliny D10 a E17 jsou mezi polyomaviry konzervované a nacházejí se i v sekvenci VP2 myšího polyomaviru (Geiger et al., 2011). Navrhli jsme tedy změny genu pro VP2 MPyV buď aminokyseliny D10 nebo E17 za neutrální nepolární alanin. Transfekované buňky v případě obou mutant produkovaly LT antigen, hlavní kapsidový protein VP1 a rovněž v nich byla detekována produkce proteinů rozpoznávaných protilátkou pro společnou část VP2/3 (Obrázek 26). Šestý den po transfekci mutantou E17A většina buněk produkovala LT antigen, v kultuře tedy docházelo k reinfekcím a k úspěšné propagaci viru. Mutovaný virus s mutací D10A jevil známky výrazně snížené infekitivity (Obrázek 27).

Elektronová mikroskopie potvrdila, že po transfekci izolované viriony obou mutant mají standartní tvar a velikost.

Analýza metodou „Western blot“ ukázala, že virová inkulata obsahují jak hlavní kapsidový protein, tak minoritní proteiny. Poměr minoritních proteinů VP2 a VP3 se u mutanty E17A podobal nemutovanému MPyV, zatímco viriony mutanty D10A obsahovaly pouze nepatrné množství proteinu VP2. Při běžných produkcích polyomavirů může docházet k výkyvům poměru minoritních proteinů (Bennett et al., 2015). V našem případě se ale jedná o výrazný rozdíl (poměr VP2/VP3 normalizovaný na WT = 0,132). Ukázali jsme, že v buňkách transfekovaných genomem MPyV D10A není VP2 produkován. Ačkoli jsme substituovali pouze jeden nukleotid, sekvenční změna byla zavedena poměrně blízko ATG kodónu (29 nukleotid) a mohla tak ovlivnit produkci proteinu. Při pokusech o zavedení mutace v blízkosti kodónu pro iniciaci translace bylo již dříve vícekrát pozorováno snížení produkce některého z minoritních proteinů. Např. v rámci studie zabývající se funkcí myristylace VP2 byla zavedena mutace do druhého

kodonu VP2 a kodon GGA byl zaměněn za CAT (gly->his). Viriony této mutanty neobsahovaly VP2 a produkce VP2 v buňkách byla velice nízká. Přitom změna kodonu ve stejném místě na CAG kódující glutamin nebo GAA, kódující kyselinu glutamovou nezpůsobila významné změny v proteinovém složení kapsidy (Mannová et al., 2002). V dalším případě, byla zavedena substituce druhé aminokyseliny proteinu VP3 (ala->val, G->A), což vedlo k tomu, že nebyl produkován protein VP3 v transfekovaných buňkách (Bílková, 2014 - diplomová práce).

Nepřítomnost mutovaného proteinu VP2 ve virionech a transfekovaných buňkách, může mít příčinu na více úrovních. Může docházet k chybám při transkripci, může být ovlivněn sestřih mRNA, transport mRNA z jádra, stabilita mRNA, translace, nebo může docházet k zvýšené degradaci proteinu.

V našem případě dochází k produkci VP3 a VP1 v transfekovaných buňkách, proto se domníváme, že transkripce pozdní oblasti MPyV a s tím spojené přepnutí z časně na pozdní transkripci probíhá normálně (Obrázek 33). Jednotlivé mRNA pozdních proteinů MPyV vznikají tak, že jsou postupně sestřihána z obřích heterogenních pre-mRNA, které jsou tvořeny i několikrát přepsanou sekvencí celého genomu. Z této velké multigenomické molekuly RNA jsou následně vystřiženy celé kopie genomu mechanismem, při kterém je sekvence „leader“ připojená k následující sekvenci „leader“ (zhruba 60 nukleotidů dlouhý nekódující úsek). Jednotlivé mRNA pro VP1 a VP3 pak vzniká dalším sestřihem sekvence „leader“ k počátku kódující sekvence („body“). Výsledkem jsou mRNA, které na 5'konci obsahují několik „leader“ sekvencí za sebou (Carmichael, 2016, review). Tvorba mRNA pro VP2 na rozdíl od mRNA pro VP3 a VP1 nevyžaduje sestřih „leader to body“, který by jinak teoreticky mohl být vnesenou mutací na počátku VP2 ovlivněn. Nicméně, mRNA pro VP2 je nejméně produkována pozdní virová mRNA a do cytoplasmy je transportována velmi neúčinně. To je způsobeno přítomností nevyužitého 5'sestřihového místa v sekvenci „leader“ na který se zřejmě mohou vázat složky spliceosomu a nejspíše tak bránit jeho transportu z jádra (Huang a Carmichael, 1996). Je možné, že námi vnesená mutace, mohla ovlivnit již tak vysoce neúčinný transport mRNA VP2 do cytoplasmy. Na druhé straně bylo ukázáno, že export z jádra nemusí být ovlivněn ani velkými delecemi v sekvenci mRNA (Huang a Carmichael, 1996). Přítomnost virových mRNA v buňce a v cytoplasmě by šel v budoucnu testovat za pomoci primerů, které by pokrývaly alespoň jednu a půl „leader“ sekvence a začátek kódující sekvence, jako bylo použito ve studii (Garren et al., 2015).

Je možné, že námi vnesená mutace, mohla ovlivnit stabilitu mRNA. V důsledku překrývajících se polyadenylačních oblastí časných a pozdních vláken RNA je polyomavirová RNA během

infekce silně editována ADAR. Výsledkem je editace velkého množství adeninů na inosiny ve virových RNA. K editaci dochází zejména v oblasti polyadenylačních míst (Garren et al., 2015). ADAR kooperuje s proteinem HuR při stabilizaci některých buněčných transkriptů (Wang et al., 2013). Zda se HuR podílí na stabilizaci polyomavirových transkriptů nevíme, ale je možné, že určité sekvenční změny by mohli vést ke snížení hypotetické vazby ADAR a HuR na transkript, čímž by bylo zabráněno stabilizaci transkriptu prostřednictvím HuR.

Změna sekvence rovněž mohla narušit interakce s ribozomem. Námi zavedená změna je mimo předpokládanou Kozakovu sekvenci. Vzhledem k tomu, že jsme nedetekovali žádné degradační meziprodukty, domníváme se, že absence VP2 v transfekovaných buňkách není způsobena zvýšenou degradací tohoto produktu.

Abychom mohli lépe určit, proč mutace vedla ke snížené produkci VP2, potřebovali bychom nejprve otestovat, zda jsou v buňce přítomny mRNA pro VP2, jak bylo zmíněno již výše. To, že jediná změna nukleotidu a aminokyseliny vedla k takto významné změně produkce proteinu je velice zajímavé. Náš mutant by se mohl použít pro další studium regulace virové exprese. Pro studium funkce kyseliny asparagové v pozici 10 na N-konci VP2 však není vhodná.

7.3 Změna infekitivity mutant D10A a E17A

Již během sledování průběhu šíření viru v kultuře během produkce mutanty D10A jsme zaznamenali, že nedochází k propagaci viru, pravděpodobně kvůli neschopnosti reinfikovat buňky. Při dalším testování jsme zjistili, že infektivita této mutanty byla 24 hpi dramaticky snížena (pod 10% efektivity WT viru). Velmi málo buněk produkovalo LT antigen i 48 hpi. Nicméně, 72 hpi byl počet buněk produkujících LT antigen téměř stejný jako v případě WT 24 hpi. Mutovaný virus D10A má výrazně sníženou schopnost infikovat buňky a průběh infekce je opožděn o 48 hpi (Graf 4 Graf 5). Tyto výsledky jsou ve shodě s literaturou. Mannová et al. publikovali, že MPyV s odstraněným iniciačním kodónem pro VP2 a mutantu MPyV H, ve které v pořadí druhá aminokyselina glycin byla změněna na histidin, v důsledku čehož viriony neobsahovaly VP2, mají výrazně sníženou schopnost infikovat buňky. Ani v těchto případech nebyla schopnost infikovat buňky zcela potlačena. Je možné si povšimnout, že v kultuře infikované mutantou H produkuje LT antigen ve 42 a ve 48 hpi podobné množství buněk jako u kultury infikované WT ve 24 hpi (Mannová et al., 2002). Tento fenotyp byl pozorován i u MPyV, který byl mutovaný v hydrofobní doméně, nacházející se v unikátní oblasti proteinu VP2. Tato mutanta se jeví jako prakticky neinfekční v časech 24 a 48 hodin po infekci, ale 72 hpi byl zaznamenán výrazný nárůst infekitivity. U tohoto viru bylo ukázáno, že jeho viriony

jsou dopraveny do ER, avšak tam jsou zadržovány patrně v důsledku snížené schopnosti účinně unikat z ER do cytosolu. (Huérffano et al., 2017). Pokud tomu tak je, pak by mutanta D10A měla být doručena do ER stejně účinně jako WT. Toto můžeme otestovat pomocí kolokalizace VP1 s proteinem BiP nebo jiným abundantním proteinem sídlícím v ER.

Při studiu viru SV40 bylo zjištěno, že substituce záporně nabitě aminokyseliny kyseliny glutamové v pozici sedmnáct proteinu VP2 na alanin nebo glutamin vede ke ztrátě infekтивности SV40. Pokud je v tomto místě zachován nabitý charakter aminokyseliny a to kladně nabitý arginin nebo lysín, ztráta infekтивности je výrazně nižší. Nabitý hydrofilní charakter aminokyseliny v této pozici proteinu VP2 SV40 je tedy nezbytný pro infekci. Aminokyselina E17 proteinu VP2 je mezi polyomaviry konzervovaná. (Geiger et al., 2011). Jak jsme ukázali, nahrazení nabitě aminokyselina v této pozici proteinu VP2 myšího polyomaviru za neutrální alanin nevedlo ke ztrátě infekтивности (Graf 4), To naznačuje, že tato aminokyselina nemá žádnou roli v cílení virionů MPyV do komplexu ERAD proteinů a případného translokonu. Zajímavé je, že naopak došlo ke zvýšení infekтивности. Zajímalo nás, zdali a jak vzrostla touto mutací hydrofobicita N-konce VP2. Proto jsme mutovanou sekvenci otestovali *in silico* programem MPEX. Predikce ukázala v důsledku sekvenční změny E17A zvýšení hydrofobního charakteru na N konci VP2. Při použití programu TMPred, který používá k predikci databázi transmembránových proteinů, byla nalezena transmembránová doména v oblasti 2-18 aminokyselin se skóre 209 pro WT a se skóre 863 pro mutantu E17A. Za signifikantní je považováno skóre nad 500. Substituce E17A tedy výrazně zvýšila hydrofobicitu N-konce VP2 MPyV. To by mohlo vést k účinnější vazbě rozvolněných virionů na membránu ER.

Pro potvrzení této hypotézy budeme muset ověřit, že je MPyV E17A doručena do ER ve stejné míře jako WT a že je úspěšnější v úniku do cytosolu. Rovněž bude třeba ověřit, že naměřená zvýšená infektivita viru E17A nebyla artefaktem způsobeným například při izolaci viru. Za tímto účelem jsme připravili a charakterizovali nové izoláty MPyV E17A a WT.

Ukázali jsme, že glutamová kyselina E17 proteinu VP2 je postradatelná pro úspěšnou infekci, zatímco význam aspartové kyseliny D10 bude třeba dále studovat. Kromě těchto dvou nabitých aminokyselin se v sekvenci MPyV nachází další negativně nabitá aminokyselina v pozici 13. Tato aminokyselina není přítomná v sekvenci SV40. Její role v infekci MPyV bude rovněž třeba prostudovat.

Zajímavé bude poznat mechanismus jakým viriony opouštějí ER. K úniku virionu pravděpodobně nedochází protažením kanálem, protože částečně rozvolněné viriony, ale i

„nucleocore“ polyomavirů jsou příliš velké. Naše hypotéza je takové, že akumulací velkého množství proteinů s transmembránovými doménami na jednom místě dochází k narušení a rozvolnění membrány a „hydrofobní“ virion je z ní vytažen pomocí chaperonů.

7.4 Příprava mutovaného MPyV v NLS strukturních proteinů

Strukturní proteiny MPyV mají jaderné lokalizační signály. V rámci této práce jsme vytvořili jednu z navržených mutant, ve které jsou NLS VP1 i minoritních kapsidových proteinů oslabeny. Tuto mutantu jsme charakterizovali a zjistili jsme, že je schopna tvořit viriony s podobnými vlastnostmi jako WT a že tyto viriony obsahují všechny tři strukturní proteiny. Zároveň jsme zjistili, že takováto mutanta nemá tendenci tvořit reverzní mutace. Mutovaný virus posloužil jako jeden z nástrojů pro studiu role NLS a importinů v cílení virového genomu do jádra. První verze manuskriptu publikace je připravována.

8 Shrnutí

Výsledky této práce lze shrnout do tří částí

Rozšíření znalostí o vztazích mezi MPyV a vybranými hostitelskými proteiny ER

Namnožili jsme a izolovali myší polyomavirus v dostatečném množství a čistotě.

Metodou konfokální mikroskopie jsme zjistili, že infekce MPyV indukuje změnu v distribuci proteinu endoplasmatického retikula DNAJ B14 a vytváření jeho shluků (foci).

Metodou konfokální mikroskopie a „proximity ligation assay“ jsme prokázali, že během časné fáze infekce se virový protein VP1 a nachází v bezprostřední blízkosti DNAJ B14 a tvoří s ním pozorované „foci“.

Zjistili jsme, že nejvyšší výskyt „foci“ je v 5 hpi, v čase pozorovaného transportu viru do buněčného jádra.

Zjistili jsme, že během časné fáze infekce dochází ke kolokalizaci proteinu VP1 a chaperonu BiP a metodou PLA jsme ověřili že se nalézají v bezprostřední blízkosti.

Vliv záporně nabitých aminokyselin na N-konci VP2 na infektivitu viru.

Provedli jsme mutagenesi a připravili dva mutantní MPyV se substitucí D10A a E17A. v kapsidovém proteinu VP2.

Charakterizovali jsme tyto mutantní viry a zjistili, že viriony viru E17A obsahují všechny kapsidové proteiny, podobně jako virus divokého typu, zatímco z mutovaného genomu viru D10A není produkován protein VP2.

Zjistili jsme, že aminokyselina E17 VP2 není nezbytná pro úspěšnou infekci. Substituce E17A vedla spíše k nárůstu efektivity.

Role aminokyseliny D10 bude muset být dále studována. Virus D10A, který téměř nemá protein VP2, má výrazně sníženou infektivitu a průběh infekce je zpomalen o 48 hodin.

Příprava mutant pro studium NLS MPyV

Provedli jsme mutagenesi a připravili MPyV s mutovanou NLS sekvencí v proteinu VP1 (K6Q) a v proteinu VP2/3 (K315A).

Charakterizovali jsme tento virus a zjistili, že je schopen tvořit normální viriony a že nemá tendenci k tvorbě zpětných mutací.

9 Seznam použité literatury

Diplomové a studentské práce

- Bílková, E. (2014): Studium vlastností minoritních strukturních proteinů myšího polyomaviru, Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha
- Morávková, A. (2001): Příprava protilátek proti hlavnímu strukturnímu proteinu myšího polyomaviru. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha.
- Primi, B. (2012): An Investigation of Endoplasmic Reticulum-Associated Proteins Implicated in Efficient Murine Polyomavirus Infection, Undergraduate Honors Theses, University of Colorado, Boulder
- Vít, O. (2010): Studium minoritních kapsidových proteinů myšího polyomaviru, Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha

Vědecké články

- Adang L, Berger J. 2015. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *F1000Research* 62:828–832.
- Bagchi P, Inoue T, Tsai B. 2016. EMC1-dependent stabilization drives membrane penetration of a partially destabilized non-enveloped virus. *Elife* 5:1–23.
- Bagchi P, Walczak CP, Tsai B. 2015. The endoplasmic reticulum membrane j protein c18 executes a distinct role in promoting simian virus 40 membrane penetration. *J Virol* 89:4058–4068.
- Barouch DH, Harrison SC. 1994. Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J Virol* 68:3982–9.
- Bennett SM, Jiang M, Imperiale MJ. 2013. Role of cell-type-specific endoplasmic reticulum-associated degradation in polyomavirus trafficking. *J Virol* 87:8843–8852.
- Bennett SM, Zhao L, Bosard C, Imperiale MJ. 2015. Role of a nuclear localization signal on the minor capsid Proteins VP2 and VP3 in BKPv nuclear entry. *Virology* 474:110–116.
- Bonifacino JS, Cosson P, Shah N, Klausner RD. 1991. Role of potentially charged transmembrane residues in targeting proteins for retention and degradation within the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 10:2783–93.
- Bracher A, Verghese J. 2015. The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones. *Front Mol Biosci* 2:1–33.
- Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC. 2003. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* 160:1115–1127.
- Brodsky JL, Pipas JM. 1998. Polyomavirus T antigens: molecular chaperones for multiprotein complexes. *J Virol* 72:5329–34.
- Burkert O, Kreßner S, Sinn L, Giese S, Simon C, Lilie H. 2014. Biophysical characterization of polyomavirus minor capsid proteins. *Biol Chem* 395:871–880.
- Butin-Israeli V, Ben-nun-Shaul O, Kopatz I, Adam SA, Shimi T, Goldman RD, Oppenheim A. 2011. Simian virus 40 induces lamin A/C fluctuations and nuclear envelope deformation during cell entry. *Nucleus* 2:320–330.
- Cai X, Chang D, Rottinghaus S, Consigli R a. 1994. Expression and purification of

- recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. *J Virol* 68:7609–7613.
- Calvignac-Spencer S, Feltkamp MCW, Daugherty MD, Moens U, Ramqvist T, Johne R, Ehlers B. 2016. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch Virol* 161:1739–1750.
- Carmichael G. 2016. Gene Regulation and Quality Control in Murine Polyomavirus Infection. *Viruses* 8:284.
- Caruso M, Belloni L, Sthandier O, Amati P, Garcia M-I. 2003a. $\alpha 4 \beta 1$ Integrin Acts as a Cell Receptor for Murine Polyomavirus at the Postattachment Level. *J Virol* 77:3913–3921.
- Caruso M, Cavaldesi M, Gentile M, Sthandier O, Amati P, Garcia MI. 2003b. Role of sialic acid-containing molecules and the $\alpha 4 \beta 1$ integrin receptor in the early steps of polyomavirus infection. *J Gen Virol* 84:2927–2936.
- Cavaldesi M, Caruso M, Sthandier O, Amati P, Garcia MI. 2004. Conformational Changes of Murine Polyomavirus Capsid Proteins Induced by Sialic Acid Binding. *J Biol Chem* 279:41573–41579.
- Clever J, Yamada M, Kasamatsu H. 1991. Import of simian virus 40 virions through nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7333–7337.
- Cormier JH, Tamura T, Sunryd JC, Hebert DN. 2009. EDEM1 recognition and delivery of misfolded proteins to the SEL1L-containing ERAD complex. *Mol Cell* 34:627–633.
- Daniels R, Rusan NM, Wadsworth P, Hebert DN. 2006a. SV40 VP2 and VP3 insertion into ER membranes is controlled by the capsid protein VP1: implications for DNA translocation out of the ER. *Mol Cell* 24:955–966.
- Daniels R, Rusan NM, Wilbuer A-K, Norkin LC, Wadsworth P, Hebert DN. 2006b. Simian Virus 40 Late Proteins Possess Lytic Properties That Render Them Capable of Permeabilizing Cellular Membranes. *J Virol* 80:6575–6587.
- Dawe CJ, Freund R, Mandel G, Ballmer-Hofer K, Talmage DA, Benjamin TL. 1987. Variations in polyoma virus genotype in relation to tumor induction in mice. Characterization of wild type strains with widely differing tumor profiles. *Am J Pathol* 127:243–61.
- Deininger P, Esty A, Laporte P, Friedmann T. 1979. Nucleotide sequence and genetic organization of the polyoma late region: Features common to the polyoma early region and SV40. *Cell* 18:771–779.
- Delos SE, Cripe TP, Leavitt a D, Greisman H, Garcea RL. 1995. Expression of the polyomavirus minor capsid proteins VP2 and VP3 in *Escherichia coli*: in vitro interactions with recombinant VP1 capsomeres. *J Virol* 69:7734–7742.
- Delos SE, Montross L, Moreland RB, Garcea RL. 1993. Expression of the polyomavirus VP2 and VP3 proteins in insect cells: coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localization. *Virology* 194:393–8.
- Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Müller L, Zimmermann R. 2009. Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol Life Sci* 66:1556–1569.
- Dupzyk A, Tsai B. 2016. How polyomaviruses exploit the ERAD machinery to cause

- infection. *Viruses* 8:1–14.
- Dupzyk A, Williams JM, Bagchi P, Inoue T, Tsai B. 2017. SGTA-dependent regulation of Hsc70 promotes cytosol entry of SV40 from the ER. *J Virol*:JVI.00232-17.
- Eddy BE, Borman GS, Grubbs GE, Young RD. 1962. Identification of the Oncogenic Substance in Rhesus Monkey Kidney Cell Cultures as Simian Virus 40. *Virology* 17:65–75.
- Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, Gosert R, Hirsch HH. 2009. Prevalence of Polyomavirus BK and JC Infection and Replication in 400 Healthy Blood Donors. *J Infect Dis* 199:837–846.
- Engels E a, Frisch M, Goedert JJ, Biggar RJ, Miller RW. 2002. Merkel cell carcinoma and HIV infection. *Lancet* 359:497–498.
- Erickson KD, Garcea RL, Tsai B. 2009. Ganglioside GT1b Is a Putative Host Cell Receptor for the Merkel Cell Polyomavirus. *J Virol* 83:10275–10279.
- Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. 2008. Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* (80-) 319:1096–1100.
- Fey G, Hirt B. 1974. Fingerprints of Polyoma Virus Proteins and Mouse Histones. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 39:235–241.
- Finch JT. 1974. The Surface Structure of Polyoma Virus. *J Gen Virol* 24:359–364.
- Fluck MM, Schaffhausen BS. 2009. Lessons in Signaling and Tumorigenesis from Polyomavirus Middle T Antigen. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:542–563.
- Forster ML, Sivick K, Park YN, Arvan P, Lencer WI, Tsai B. 2006. Protein disulfide isomerase-like proteins play opposing roles during retrotranslocation. *J Cell Biol* 173:853–859.
- Forstova J, Krauzewicz N, Sandig V, Elliott J, Palkova Z, Strauss M, Griffin BE, Al FET. 1995. Polyomavirus Pseudocapsids as Efficient Carriers of Heterologous DNA into Mammalian Cells. *Hum Gene Ther* 6:297–306.
- Forstova J, Krauzewicz N, Wallace S, Street AJ, Dilworth SM, Beard S, Griffin BE. 1993. Cooperation of Structural Proteins during Late Events in the Life Cycle of Polyomavirus. *J Virol* 67:1405–1413.
- Frearson PM, Crawford L V. 1972. Polyoma virus basic proteins. *J Gen Virol* 14:141–155.
- Friedmann T, Esty A, LaPorte P, Deininger P. 1979. The nucleotide sequence and genome organization of the polyoma early region: Extensive nucleotide and amino acid homology with SV40. *Cell* 17:715–724.
- Garren SB, Kondaveeti Y, Duff MO, Carmichael GG. 2015. Global Analysis of Mouse Polyomavirus Infection Reveals Dynamic Regulation of Viral and Host Gene Expression and Promiscuous Viral RNA Editing. *PLoS Pathog* 11:1–25.
- Geiger R, Andrichke D, Friebe S, Herzog F, Luisoni S, Heger T, Helenius A. 2011. BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Nat Cell Biol* 13:1305–1314.
- Gheit T, Dutta S, Oliver J, Robitaille A, Hampras S, Combes J-D, McKay-Chopin S, Le

- Calvez-Kelm F, Fenske N, Cherpelis B, Giuliano AR, Franceschi S, McKay J, Rollison DE, Tommasino M. 2017. Isolation and characterization of a novel putative human polyomavirus. *Virology* 506:45–54.
- Gilbert J, Benjamin T. 2004. Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *J Virol* 78:12259–67.
- Gilbert JM, Benjamin TL. 2000. Early steps of polyomavirus entry into cells. *J Virol* 74:8582–8.
- Gilbert JM, Goldberg IG, Benjamin TL. 2003. Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *J Virol* 77:2615–22.
- Gillock ET, Rottinghaus S, Chang D, Cai X, Smiley SA, An K, Consigli RA. 1997. Polyomavirus major capsid protein VP1 is capable of packaging cellular DNA when expressed in the baculovirus system. *J Virol* 71:2857–65.
- Giorda KM, Raghava S, Zhang MW, Hebert DN. 2013. The viroporin activity of the minor structural proteins VP2 and VP3 is required for SV40 propagation. *J Biol Chem* 288:2510–2520.
- Goodwin EC, Lipovsky A, Inoue T, Magaldi T, Edwards A, Van Goor K, Adrienne P, Paton J, Atwood E, Tsai B, DiMaio D. 2011. BiP and Multiple DNAJ Molecular Chaperones in the Endoplasmic Reticulum Are Required for Efficient Simian Virus 40 Infection. *MBio* 2:e00101-11.
- Goodwin EC, Motamedi N, Lipovsky A, Fernández-Busnadiego R, DiMaio D. 2014. Expression of DNAJB12 or DNAJB14 Causes Coordinate Invasion of the Nucleus by Membranes Associated with a Novel Nuclear Pore Structure. *PLoS One* 9:e94322.
- Griffith JP, Griffith DL, Rayment I, Murakami WT, Caspar DLD. 1992. Inside polyomavirus at 25-Å resolution. *Nature* 355:652–654.
- Gross L. 1953. Neck tumors, or leukemia, developing in adult C3H mice following inoculation, in early infancy, with filtered (Berkefeld N), or centrifugated (144,000 x g), Ak-leukemic extracts. *Cancer* 6:948–957.
- Huang CH, Hsiao HT, Chu YR, Ye Y, Chen X. 2013. Derlin2 protein facilitates HRD1-mediated retro-translocation of sonic hedgehog at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 288:25330–25339.
- Huang Y, Carmichael GG. 1996. A suboptimal 5' splice site is a cis-acting determinant of nuclear export of polyomavirus late mRNAs. *Mol Cell Biol* 16:6046–54.
- Huérffano S, Ryabchenko B, Španielová H, Forstová J. 2017. Hydrophobic domains of mouse polyomavirus minor capsid proteins promote membrane association and virus exit from the ER. *FEBS J* 284:883–902.
- Huerfano S, Žila V, Bouřa E, Španielová H, Štokrová J, Forstová J. 2010. Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection. *FEBS J* 277:1270–1283.
- Chang D, Cai X, Consigli RA. 1993. Characterization of DNA Binding Properties of Polyomavirus Capsid Proteins. *J Virol* 67:6327–6331.
- Chang D, Haynes JI, Brady JN, Consigli RA. 1992. Identification of a nuclear localization

- sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology* 191:978–983.
- Chen XS, Stehle T, Harrison SC. 1998. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J* 17:3233–3240.
- Christianson JC, Olzmann JA, Shaler TA, Sowa ME, Bennett EJ, Richter CM, Tyler RE, Greenblatt EJ, Wade Harper J, Kopito RR. 2011. Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy. *Nat Cell Biol* 14:93–105.
- Christianson JC, Shaler T a, Tyler RE, Kopito RR. 2008. OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol* 10:272–282.
- Inoue T, Dosey A, Herbstman JF, Ravindran MS, Skinotis G, Tsai B. 2015. ERdj5 Reductase Cooperates with Protein Disulfide Isomerase To Promote Simian Virus 40 Endoplasmic Reticulum Membrane Translocation. *J Virol* 89:8897–8908.
- Inoue T, Tsai B. 2011. A large and intact viral particle penetrates the endoplasmic reticulum membrane to reach the cytosol. *PLoS Pathog* 7:e1002037.
- Inoue T, Tsai B. 2015. A Nucleotide Exchange Factor Promotes Endoplasmic Reticulum-to-Cytosol Membrane Penetration of the Nonenveloped Virus Simian Virus 40. *J Virol* 89:4069–4079.
- Jamboti JS. 2016. BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *Nephrology* 21:647–654.
- Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ. 2009. Early events during BK virus entry and disassembly. *J Virol* 83:1350–1358.
- Krauzewicz N, Streuli CH, Stuart-Smith N, Jones MD, Wallace S, Griffin BE. 1990. Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *J Virol* 64:4414–4420.
- Ladasky JJ, Boyle S, Seth M, Li H, Pentcheva T, Abe F, Steinberg SJ, Edidin M. 2006. Bap31 enhances the endoplasmic reticulum export and quality control of human class I MHC molecules. *J Immunol* 177:6172–6181.
- Li M, Delos SE, Montross L, Garcea RL. 1995. Polyomavirus VP1 phosphorylation: coexpression with the VP2 capsid protein modulates VP1 phosphorylation in Sf9 insect cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5992–5996.
- Liebl D, Difato F, Horn L, Mannova P, Jitka S. 2006. Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes , Requires Their Acidic pH for Productive Infection , and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes ~tokrova. *J Virol* 80:4610–4622.
- Lilley BN, Gilbert JM, Ploegh HL, Benjamin TL. 2006. Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection. *J Virol* 80:8739–8744.
- Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. 2006. Identification of Gangliosides GD1b and GT1b as Receptors for BK Virus. *J Virol* 80:1361–1366.
- Mackay RL, Consigli R a. 1976. Early events in polyoma virus infection: attachment, penetration, and nuclear entry. *J Virol* 19:620–36.
- Magnuson B, Rainey EK, Benjamin T, Baryshev M, Mkrtchian S, Tsai B. 2005. ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol*

Cell 20:289–300.

- Mannová P, Forstová J. 2003. Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *J Virol* 77:1672–1681.
- Mannová P, Liebl D, Krauzewicz N, Fejtová A, Štokrová J, Palková Z, Griffin BE, Forstová J. 2002. Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J Gen Virol* 83:2309–2319.
- McMillen J, Consigli RA. 1974. In vitro radioisotopic labeling of proteins associated with purified polyoma virions. *J Virol* 14:1627–9.
- van der Meijden E, Janssens RWA, Lauber C, Bavinck JNB, Gorbalenya AE, Feltkamp MCW. 2010. Discovery of a new human polyomavirus associated with Trichodysplasia Spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog* 6(7) e1001024.
- Moreland RB, Garcea RL. 1991. Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology* 185:513–518.
- Morito D, Hirao K, Oda Y, Hosokawa N, Tokunaga F, Cyr D, Tanaka K, Iwai K, Nagata K. 2008. Gp78 Cooperates with RMA1 in Endoplasmic Reticulum-associated Degradation of CFTRdeltaF508. *Mol Biol Cell* 19:1328–1336.
- Nakanishi A, Clever J, Yamada M, Li PP, Kasamatsu H. 1996. Association with capsid proteins promotes nuclear targeting of simian virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:96–100.
- Nakanishi A, Li PP, Qu Q, Jafri QH, Kasamatsu H. 2007. Molecular dissection of nuclear entry-competent SV40 during infection. *Virus Res* 124:226–230.
- Nakanishi A, Shum D, Morioka H, Otsuka E, Kasamatsu H. 2002. Interaction of the Vp3 nuclear localization signal with the importin alpha 2/beta heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40. *J Virol* 76:9368–77.
- Nemethova M, Smutny M, Wintersberger E. 2004. Transactivation of E2F-Regulated Genes by Polyomavirus Large T Antigen: Evidence for a Two-Step Mechanism. *Mol Cell Biol* 24:10986–10994.
- Norkin LC, Anderson H a, Wolfrom S a, Oppenheim A. 2002. Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J Virol* 76:5156–5166.
- Oda Y, Okada T, Yoshida H, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. 2006. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J Cell Biol* 172:383–393.
- Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius a. 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3:473–483.
- Pho MT, Ashok A, Atwood WJ. 2000. JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Virol* 74:2288–2292.
- Qian M, Cai D, Verhey KJ, Tsai B. 2009. A lipid receptor sorts polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection. *PLoS Pathog* 5(6) e1000465.
- Qian M, Tsai B. 2010. Lipids and proteins act in opposing manners to regulate polyomavirus

- infection. *J Virol* 84:9840–52.
- Qu Q, Sawa H, Suzuki T, Semba S, Henmi C, Okada Y, Tsuda M, Tanaka S, Atwood WJ, Nagashima K. 2004. Nuclear Entry Mechanism of the Human Polyomavirus JC Virus-like Particle: ROLE OF IMPORTINS AND THE NUCLEAR PORE COMPLEX. *J Biol Chem* 279:27735–27742.
- Rainey-Barger EK, Magnuson B, Tsai B. 2007. A Chaperone-Activated Nonenveloped Virus Perforates the Physiologically Relevant Endoplasmic Reticulum Membrane. *J Virol* 81:12996–13004.
- Ravindran MS, Bagchi P, Inoue T, Tsai B. 2015. A Non-enveloped Virus Hijacks Host Disaggregation Machinery to Translocate across the Endoplasmic Reticulum Membrane. *PLOS Pathog* 11:e1005086.
- Rayment I, Baker TS, Caspar DL, Murakami WT. 1982. Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 295:110–115.
- Richterová Z, Liebl D, Horák M, Palková Z, Stokrová J, Hozák P, Korb J, Forstová J. 2001. Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol* 75:10880–10891.
- Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J, DoRosario A, Scanlon JJ, Laga AC, Martinez-Fernandez A, Barletta JA, Bellizzi AM, Sadasivam S, Holloway DT, Cooper DJ, Kupper TS, Wang LC, DeCaprio JA. 2012. Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J Clin Invest* 122:4645–4653.
- Sahli R, Freund R, Dubensky T, Garcea R, Bronson R, Benjamin T. 1993. Defect in Entry and Altered Pathogenicity of a Polyoma Virus Mutant Blocked in VP2 Myristylation. *Virology* 192:142–153.
- Salunke DM, Caspar DLD, Garcea RL. 1986. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46:895–904.
- Satoh T, Ohba A, Liu Z, Inagaki T, Satoh A. 2015. EMC is essential for biosynthesis of rhodopsin and other multipass membrane proteins in *Drosophila* photoreceptors. *Seikagaku* 87:781–784.
- Schelhaas M, Malmström J, Pelkmans L, Haugstetter J, Ellgaard L, Grünewald K, Helenius A. 2007. Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell* 131:516–529.
- Soeda E, Arrand JR, Smolar N, Griffin BE. 1979. Sequence from early region of polyoma virus DNA containing viral replication origin and encoding small, middle and (part of) large T antigens. *Cell* 17:357–370.
- Sopha P, Kadokura H, Yamamoto Y, Takeuchi M, Saito M, Tsuru A, Kohno K. 2012. A novel mammalian ER-located J-protein, DNAJB14, can accelerate ERAD of misfolded membrane proteins. *Cell Struct Funct* 187:177–187.
- Stehle T, Harrison SC. 1996. Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 4:183–194.
- Streuli CH, Griffin BE. 1987. Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature* 326:619–622.

- Sullivan CS, Sung CK, Pack CD, Grundhoff A, Lukacher AE, Benjamin TL, Ganem D. 2009. Murine Polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection. *Virology* 387:157–167.
- Sweet BH, Hilleman MR. 1960. The Vacuolating Virus, S.V.40. *Exp Biol Med* 105:420–427.
- Šroller V, Hamšíková E, Ludvíková V, Vochozková P, Kojzarová M, Fraiberk M, Saláková M, Morávková A, Forstová J, Němečková Š. 2014. Seroprevalence rates of BKV, JCV, and MCPyV polyomaviruses in the general Czech Republic population. *J Med Virol* 86:1560–1568.
- Tsai B, Gilbert JM, Stehle T, Lencer W, Benjamin TL, Rapoport TA. 2003. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J* 22:4346–4355.
- Tyndall C, Mantia G La, Thacker CM, Favalaro J, Kamen R. 1981. A region of the polyoma virus genome between the replication origin and late protein coding sequences is required in cis for both early gene expression and viral DNA replication. *Nucleic Acids Res* 9:6231–6250.
- Wakana Y, Takai S, Nakajima K-I, Tani K, Yamamoto A, Watson P, Stephens DJ, Hauri H-P, Tagaya M. 2008. Bap31 is an itinerant protein that moves between the peripheral endoplasmic reticulum (ER) and a juxtanuclear compartment related to ER-associated Degradation. *Mol Biol Cell* 19:1825–36.
- Walczak C, Ravindran M, Inoue T, Tsai B. 2014. A Cytosolic Chaperone Complexes with Dynamic Membrane J-Proteins and Mobilizes a Nonenveloped Virus out of the Endoplasmic Reticulum. *PLoS Pathog* 10:e1004007.
- Walczak CP, Tsai B. 2011. A PDI family network acts distinctly and coordinately with ERp29 to facilitate polyomavirus infection. *J Virol* 85:2386–96.
- Wang B, Heath-Engel H, Zhang D, Nguyen N, Thomas DY, Hanrahan JW, Shore GC. 2008. BAP31 interacts with Sec61 translocons and promotes retrotranslocation of CFTRΔF508 via the derlin-1 complex. *Cell* 133:1080–1092.
- Wang IX, So E, Devlin JL, Zhao Y, Wu M, Cheung VG. 2013. ADAR Regulates RNA Editing, Transcript Stability, and Gene Expression. *Cell Rep* 5:849–860.
- Yamada M, Kasamatsu H. 1993. Role of nuclear pore complexes in simian virus 40 nuclear targeting. *J Virol* 67:119–130.
- Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport T a. 2004. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429:841–847.
- Yin H, Wang H, Zong H, Chen X, Wang Y, Yun X, Wu Y, Wang J, Gu J. 2006. SGT, a Hsp90β binding partner, is accumulated in the nucleus during cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 343:1153–8.
- Younger JM, Chen L, Ren H-Y, Rosser MFN, Turnbull EL, Fan C-Y, Patterson C, Cyr DM. 2006. Sequential Quality-Control Checkpoints Triage Misfolded Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Cell* 126:571–582.
- Zila V, Difato F, Klimova L, Huerfano S, Forstova J. 2014. Involvement of microtubular network and its motors in productive endocytic trafficking of mouse polyomavirus. *PLoS One* 9 e96922.

